



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DA PROTEÍNA HEME OXIGENASE 1 NA
INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania chagasi***

Nívea Farias Luz

Salvador-Bahia-Brasil

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**PAPEL DA PROTEÍNA HEME OXIGENASE 1 NA
INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania chagasi***

Nívea Farias Luz

Orientador: Dr^a. Valéria de Matos Borges

**Dissertação apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós Graduação em Patologia Humana,
como pré requisito obrigatório para obtenção
do grau de Mestre**

Salvador-Bahia-Brasil

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Luz, Nivea Farias

L979p Papel da proteína heme oxigenase 1 na infecção de macrófagos por
leishmania chagasi [manuscrito] / por Nívea Farias Luz . – 2011.

88 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia. Centro
de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Valéria de Matos Borges, Laboratório
Integrado de Microbiologia e Imunoregulação.

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmania chagasi. 3. Infecção. 4.
Macrófago. I. Título.

CDU 616.993.161

Folha de aprovação

DEDICATÓRIA

A Deus, presença constante.

A meus pais Domingos e Sônia, minhas asas e raízes

e a Vitor Andrade (*in memoriam*)

AGRADECIMENTO

A Deus, pelo amor, presença real e por ter colocado tantas oportunidades e pessoas especiais em minha vida,

Aos meus pais Sônia e Domingos e irmãs, Milena, Larissa e Priscila, pelo amor, apoio, compreensão e dedicação, nada faria sentindo sem vocês,

A minha orientadora, Valéria Borges, por ter me confiado esse projeto, pela dedicação e comprometimento com todas as etapas da realização desse trabalho, pelas correções, cobranças e envolvimento no meu desenvolvimento científico e pessoal,

A minha co-orientadora na iniciação científica, Deboraci Prates, pelos ensinamentos, entusiasmo e amizade,

Aos meus colegas Théo e Jaqueline pelas sugestões, correções e por fazerem da nossa bancada um ambiente agradável de trabalho,

A Bruno Bezerril, pela oportunidade de colaboração em um dos seus trabalhos e pelas sugestões ao trabalho e discussão de dados,

A Vítor Rosa e Grazielle pela chance de acompanhá-los na iniciação científica,

Ao CPqGM e seus funcionários, especialmente ao Biotério, Biblioteca, Coordenação de Ensino da Pós Graduação em Patologia Humana,

Ao CNPq pelo suporte financeiro,

Aos Técnicos e Secretárias LIMI-LIP (Jorge Tolentino, Natali, Edvaldo, Elaine, Juqueline, Andrezza e Elze),

Aos pesquisadores LIMI-LIP, Manoel Barral, Aldina Barral, Claudia Brodskyn, Johan van Weyenbergh, Theolis Barbosa, Camila Oliveira, Jorge Clarêncio pelas valorosas contribuições e por propiciar um ambiente de aprendizado.

Aos meus amigos pela compreensão e apoio, especialmente a Neila, Bárbara, Clariana, Helen, Paulo Júnior, Oriana, Éber e Luana,

Aos integrantes do laboratório chefiado pelo Prof. Marcelo Bozza na UFRJ, por terem me recebido tão bem e especialmente a Daniel Feijó e o próprio Marcelo pelas sugestões e contribuições intelectuais e experimentais ao trabalho,

Agradeço a todas as pessoas que ajudaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e meu crescimento científico e pessoal neste período.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS -----	10
LISTA DE ABREVIATURAS-----	12
RESUMO -----	14
ABSTRACT -----	15
INTRODUÇÃO -----	16
Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp -----	16
Aspectos gerais da leishmaniose visceral -----	17
O heme e seus efeitos -----	19
Sistema heme- heme oxigenase: caracterização e função-----	21
Papel da HO-1 e do heme em doenças infecciosas -----	24
Papel da HO-1 em doenças infecciosas parasitárias -----	26
JUSTIFICATIVA -----	28
OBJETIVOS -----	29
OBJETIVO GERAL-----	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	29
DESENHO EXPERIMENTAL -----	30
Abordagem experimental I: Avaliação da carga parasitária -----	30
Abordagem experimental II: Avaliação de mediadores -----	31
Abordagem experimental III: Avaliação da carga parasitária em macrófagos <i>knockout</i> no gene <i>Hmox1</i> -----	32
MATERIAL E MÉTODOS -----	33
RESULTADOS -----	39
Indução da HO-1 na infecção de macrófagos por <i>L. chagasi</i> -----	39
Modulação farmacológica da liberação de HO-1 na presença de SnPP e CoPP em macrófagos infectados com <i>L. chagasi</i> -----	40
Interferência na carga parasitária em presença das drogas moduladoras da atividade e expressão da HO-1 -----	42

Infecção por <i>L. chagasi</i> em macrófagos deficientes no gene da <i>Hmox1</i> -----	44
O tratamento com CoPP reduz a produção de TNF, um importante mecanismo leishmanicida do macrófago.-----	46
A indução de HO-1 pela CoPP aumenta a razão IL-10/TNF-----	47
O tratamento com CoPP reduz a produção de óxido nítrico (NO) frente a estimulação por LPS	49
A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de IL-6 e IL-1 β frente a estimulação por LPS	50
A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção da quimiocina MCP-1 induzida pela estimulação com LPS -----	52
A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de PGE ₂ induzida pela estimulação por LPS -	53
Interferência na via da HO-1 na avaliação da carga parasitária de <i>L. chagasi</i> em macrófagos estimulados com LPS -----	54
DISCUSSÃO -----	56
CONCLUSÕES: -----	69
Conclusão Geral:-----	69
BIBLIOGRAFIA-----	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida da *Leishmania* sp.

Figura 2- Distribuição da leishmaniose visceral no mundo

Figura 3- Biossíntese do heme

Figura 4- Degradação do heme pela HO-1

Figura 5- Controle de toxicidade das protoporfirinas SnPP e CoPP sobre macrófagos e promastigotas de *L. chagasi*

Figura 6- Infecção por *L. chagasi* induz a proteína HO-1.

Figura 7- A droga indutora da HO-1, CoPP induz aumento na liberação da proteína HO-1, enquanto que a droga inibidora, SnPP, reduz esse efeito.

Figura 8- CoPP aumenta a carga parasitária na infecção por *L. chagasi*, enquanto que a SnPP não interfere na proliferação do parasito.

Figura 9- Macrófagos derivados de medula de camundongos Scid e Balb/c deficientes no gene Hmox1 têm a carga parasitária reduzida quando infectados por *L. chagasi*.

Figura 10- O tratamento com CoPP reduz a produção de TNF em resposta à infecção por *L. chagasi*.

Figura 11- A indução de HO-1 pela CoPP aumenta a presença de IL-10 em relação à de TNF.

Figura 12- A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de NO induzida frente à estimulação por LPS.

Figura 13- A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de IL-6 e IL1 β induzida frente à estimulação por LPS

Figura 14- A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de MCP-1 frente à estimulação por LPS.

Figura 15- A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de PGE2 frente à estimulação por LPS.

Figura 16- CoPP aumenta a carga parasitária de *L. chagasi* em macrófagos infectados na presença de LPS

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA Análise de Variância

CBA *Cytometric Bead Array*

COX Ciclooxygenase

ELISA ensaio imunoenzimático, do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”

HBV Vírus da Hepatite B

i.p. Intra Peritoneal

IFN Interferon

IL-10 Interleucina 10

IL-1 β Interleucina 1 β

IL-6 Interleucina 6

iNOS óxido nítrico sintetase induzível

LPS Lipopolissacarídeo

M-CFC *Macrophage Colony-Forming Cell*

MCP Proteína Quimiotática de Monócitos do inglês “*Monocyte chemoattractant protein*”

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo P

PCR Reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Polymerase chain reaction*”

PGE2 Prostaglandina E 2

PKC Proteína quinase C, do inglês *protein kinase C*

PPAR- γ receptor ativado da proliferação de peroxissomos, do inglês “*peroxisome proliferator-activated receptors*”

ROS Espécies reativas de oxigênio, do inglês “*reactive oxygen species*”

SBF Soro bovino fetal

SD Desvio padrão, do inglês “*standard deviation*”

TGF- β Fator transformante de crescimento β “*Transforming growth factor β* ”

Th célula T auxiliadora, “*T helper*”

TLR *Toll-like receptors*

TNF fator de necrose tumoral

UV Ultravioleta

XTT Hidróxido de tetrazólio

ZnPP Zinco protoporfirina “*Zinc protophorfirin IX*”

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) apresenta ampla distribuição geográfica e é fatal caso não seja tratada. As manifestações hematológicas são constantes na LV e em casos não tratados os pacientes evoluem à óbito por sangramento maciço ou anemia grave. Neste cenário, mecanismos ligados à hemólise, metabolismo do heme e atividade da enzima heme oxigenase podem estar envolvidos na imunopatogênese da LV, no entanto essa perspectiva ainda não foi explorada. A heme oxigenase (HO) tem importantes propriedades regulatórias e está envolvida em processos fisiológicos e patofisiológicos como citoproteção e inflamação. Apesar de sua sugestiva participação no contexto da infecção por *Leishmania*, uma rápida pesquisa no PubMed com as palavras heme oxigenase e *Leishmania* remete a somente três trabalhos até a presente data. Nesse projeto testaremos a hipótese de que a ativação da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) favorece a infecção por *Leishmania (L) chagasi*, principal agente etiológico da LV humana no Brasil. Nossas observações nesse trabalho indicam que a enzima HO-1 é induzida em macrófagos durante a infecção por *L. chagasi* e que a indução farmacológica da HO-1, pela CoPP aumenta a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. chagasi* e reduz a produção de mediadores pró-inflamatórios frente à estimulação por LPS, tais como TNF, NO, PGE2, MCP-1, IL-1 β e IL-6. Além disso, a HO-1 favorece um ambiente anti-inflamatório onde prevalece a presença de IL-10 sobre a de TNF. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos deficientes no gene HO-1 tem menor carga parasitária, quando infectados por *L. chagasi* em comparação aos macrófagos de camundongos selvagens. Esses achados indicam um potencial deletério para a HO-1 na infecção por *L. chagasi*, bem como sugerem possíveis mecanismos envolvidos na imunopatogênese da LV.

Palavras-chaves:

1. Leishmaniose visceral; 2. *Leishmania chagasi*; 3. Infecção; 4. Heme oxigenase-1; 5. macrófago.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a widespread disease and is fatal if left untreated. Hematological manifestations are common in VL and untreated patients evolve to death from massive bleeding and severe anemia. In this scenario, mechanisms related to hemolysis, heme metabolism and enzyme activity of heme oxygenase may be involved in the immunopathogenesis of VL. But that panorama has not been explored. Heme oxygenase (HO) has important regulatory properties and is involved in patho-physiological processes such as cytoprotection and inflammation. Despite HO participation in the context of *Leishmania* infection is suggestive, a quick search on PubMed with the words heme oxygenase and *Leishmania* refers to only three papers to date. This project will test the hypothesis that heme oxygenase- 1 (HO-1) activation favors *Leishmania (L) chagasi*, the main etiology agent of human VL in Brazil. Our observations indicate that HO-1 is induced in macrophages during *L. chagasi* infection and pharmacological induction of HO-1 by CoPP increases parasite load of infected macrophages and results in inhibition of TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, PGE2 and Nitrite levels upon LPS stimulation and simultaneously induced a higher IL-10/TNF- α ratio in peritoneal macrophages contributing to the anti inflammatory pathway that favors *L. chagasi* replication. Beyond this, we observed that bone marrow derived macrophages knockout to HO-1 gene have a significant low parasite load when infected by *L. chagasi* than their wild type counterparts. In summary, our findings suggest that this enzyme can play a deleterious role in VL and clarify one of the immunoregulatory mechanisms involved in VL.

Key-words:

1. Visceral leishmaniasis;
2. *Leishmania chagasi*;
3. Infection;
4. Heme oxygenase-1;
5. macrophage.

INTRODUÇÃO

Ciclo biológico da Leishmania sp

As leishmanioses são transmitidas por insetos vetores da ordem Diptera e família Psychodidae, conhecidos como flebótomos. Esses insetos podem ser endêmicos do Velho Mundo (gênero *Phlebotomus*) ou das Américas (gênero *Lutzomyia*) (SOARES & TURCO, 2003). Os agentes etiológicos das leishmanioses são os protozoários do gênero *Leishmania*, um grupo de protozoários flagelados da família Tripanossomatidae, ordem Kinetoplastida. Esses parasitos são digenéticos, apresentando diferentes morfologias nas várias etapas do ciclo biológico. As promastigotas de *Leishmania sp.* são formas flageladas, móveis e extracelulares, encontradas no trato digestivo do inseto flebotomíneo. Já as amastigotas são formas intracelulares encontradas dentro de vacúolos presentes nas células fagocitárias do hospedeiro vertebrado (WILLIAMS, 2000). A transmissão para o hospedeiro vertebrado se dá pela picada do flebótomo infectado com a *Leishmania* durante o repasto sanguíneo (**Figura 1**). Nesse momento, promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele do hospedeiro, juntamente com produtos da glândula salivar (RIBEIRO, 1995). Dentro das células fagocitárias, as promastigotas transformam-se em amastigotas e se replicam. O ciclo é completado quando o hospedeiro vertebrado torna-se uma nova fonte de parasitas para os vetores, quando estes, ao se alimentarem, ingerem sangue contendo células infectadas, revisto por (ANDRADE et al., 2007).

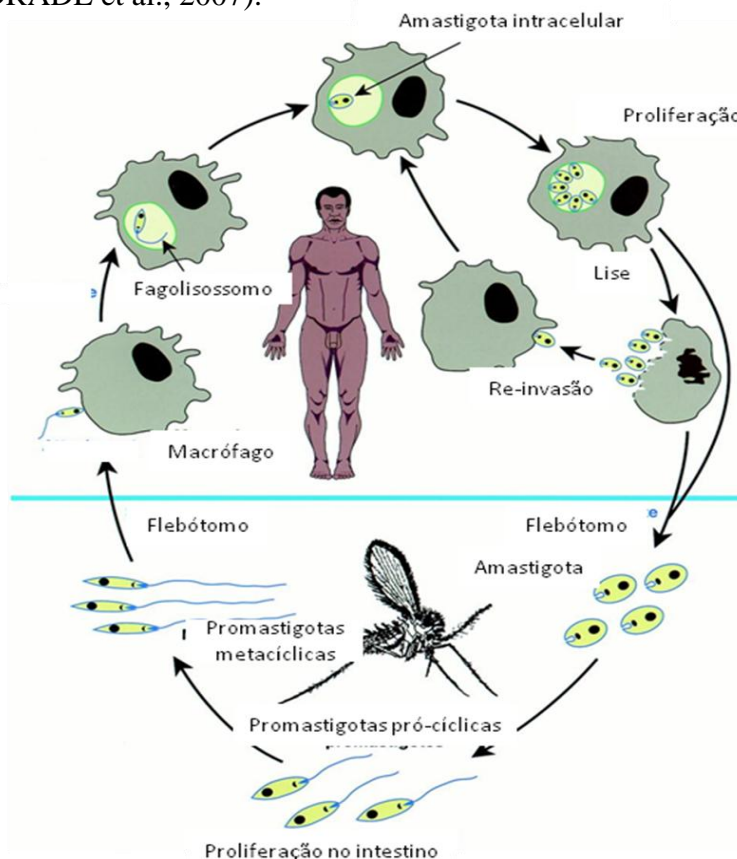


Figura 1- Ciclo de vida da *Leishmania sp*

Fonte: "Parasites and Pestilence. Stanford University

Aspectos gerais da leishmaniose visceral

A leishmaniose é uma doença multifatorial, caracterizada pela diversidade e complexidade da resposta do hospedeiro, agentes etiológicos e vetores, uma vez que pode ser causada por mais de 20 espécies de *Leishmania* e transmitida para os humanos por aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos vetores (PEARSON & SOUSA, 1996).

A maioria das espécies que causam leishmaniose visceral (LV) pertencem ao complexo *L. donovani* (LUKES et al., 2007). Existem aproximadamente 500.000 casos de leishmaniose visceral (LV) e mais de 50.000 mortes dessa doença por ano, um número que só é ultrapassado entre as doenças parasitárias pela malária (WHO, 2002). A maioria dos casos (>90%) ocorre em apenas seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (**Figura 2**), afetando comunidades pobres, geralmente em áreas rurais remotas (CHAPPUIS et al., 2007).



Figura 2- Distribuição da leishmaniose visceral no mundo

Fonte- Chappuis, et al., 2007

As estratégias de tratamento da LV são caracterizadas pela utilização de drogas leishmanicidas, assim como o tratamento de infecções concomitantes. O antimonial pentavalente estibogluconato de sódio e a meglumina antimonial são as drogas usadas por

mais de 70 anos (VEEKEN et al., 2000; GOTO & LINDOSO, 2010). Antimoniais são drogas tóxicas com possíveis efeitos colaterais graves, incluindo arritmia cardíaca e pancreatite aguda, são especialmente agressivos e podem levar a morte pacientes com menos de 2 anos ou mal nutridos.

As manifestações da LV podem variar desde a infecção assintomática, até a doença progressiva e potencialmente fatal, caracterizada por febre, emagrecimento, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e caquexia, mas com grande variabilidade entre os indivíduos (BERMAN, 1997). A LV predomina em crianças nos primeiros anos de vida e associa-se a grande morbidade e elevado número de óbitos (AL-JURAYYAN et al., 1995).

Os sinais e sintomas da LV são apresentados após um período de incubação de 2 a 6 semanas de infecção, consistindo inflamação sistêmica persistente (febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso) e invasão parasitária do sangue e do sistema retículo endotelial, assim como aumento de linfonodos, baço e fígado (Chappuis, Sundar et al., 2007). As manifestações hematológicas são constantes na LV, As anormalidades mais freqüentes relatadas envolvem pancitopenia, anemia megaloblástica e ferropriva, síndrome hemolítica e alterações do sistema de coagulação sanguínea. Diversos mecanismos patogênicos estão envolvidos neste processo, incluindo hiperesplenismo, mecanismos imunológicos, auto-imunidade e disfunção da medula-óssea revisto por (BACELLAR, 2005). A fadiga e fraqueza são agravadas pela anemia, que é causada pelo estado de inflamação persistente, hiperesplenismo (a destruição periférica dos eritrócitos no baço) e algumas vezes pelo sangramento (MAURICIO et al., 2000; COSTA, 2009).

Mecanismos ligados à hemólise, metabolismo do heme e ativação da enzima heme oxigenase podem estar envolvidos no sangramento, na fase da doença que envolve coagulação e anemia grave, e especialmente na interação de células do sistema imune com o parasito, no entanto isso ainda não foi explorado.

Nesse estudo buscamos investigar o papel da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) na resposta à infecção *in vitro* por *L. chagasi*.

O heme e seus efeitos

A síntese do heme ocorre em diversos organismos metazoários via oito etapas enzimáticas que utilizam glicina, succinil-CoA e ferro como substrato. A primeira e as três últimas etapas da síntese de heme ocorrem na mitocôndria, enquanto que as outras etapas ocorrem no citosol (SCHULTZ et al., 2010). A formação de heme envolve a participação sequencial de oito enzimas - aminolevulanato sintase (ALA), aminolevulanato desidratase (ALA-D), porfobilinogênio deaminase (PBGD), uroporfirinogênio III sintase (URO-S), uroporfirinogênio III descarboxilase (URO-D), coproporfirinogênio III oxidase (CPO), protoporfirinogênio III oxidase (PPO) e ferroquelatase (FC). O heme recém sintetizado pode então ser incorporado em heme proteínas ou pode ser degradado (WAGENER et al., 2003) (**Figura 3**).

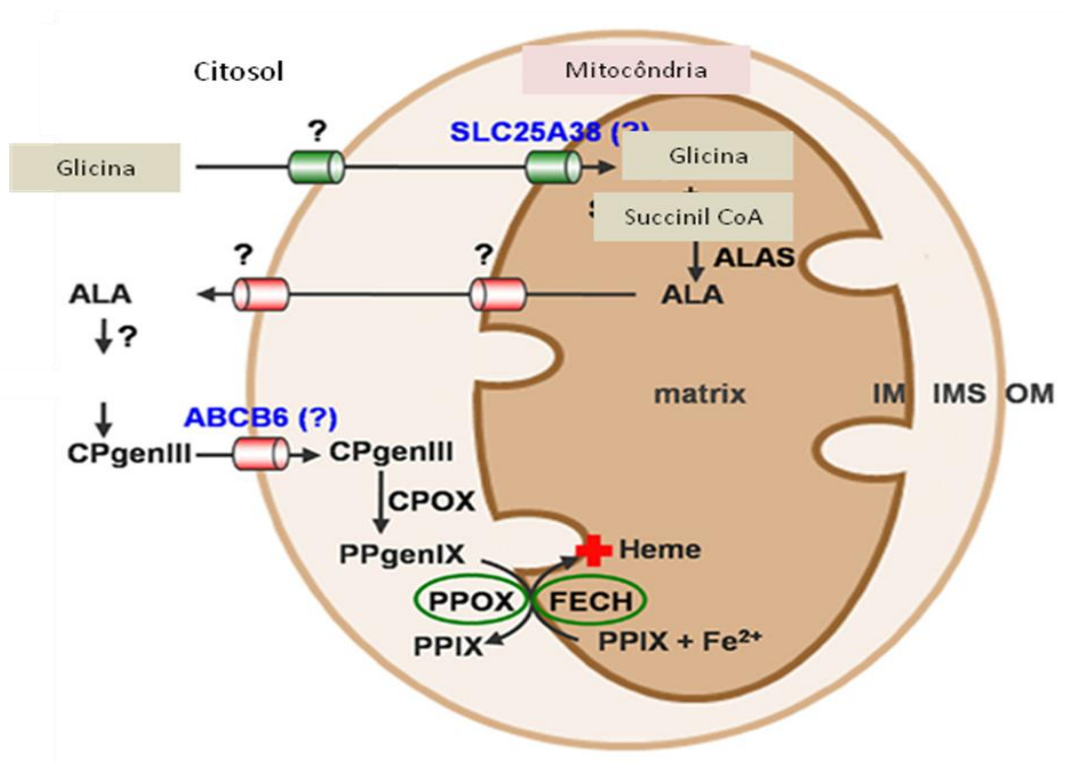


Figura 3- Biossíntese do heme

A função do heme é atribuída pela proteína a qual está ligado (GOZZELINO et al., 2010). Em proteínas como hemoglobina e mioglobulina, o heme age como carreador de gases, já em proteínas como citocromo C, citocromo C oxidase e redutase, o heme age como transportador de elétrons. Tem sido proposto que o heme é uma molécula evolutivamente conservada para a incorporação de Fe^{2+} em estruturas protéicas terciárias.

A taxa mais rápida de síntese de heme ocorre entre eritrócitos na medula óssea (75% do total de heme no corpo) e nos hepatócitos (WAGENER et al., 2001). No corpo humano, 65-75% do ferro total está presente como heme nas células vermelhas do sangue (ANDREWS, 2000). Após uma meia vida de 120 dias, eritrócitos senescentes são fagocitados por macrófagos do sistema fagocítico mononuclear retículo-endotelial e removidos da circulação. Uma vez que os eritrócitos sejam lisados nos macrófagos, o anel de heme é liberado no lúmen do fagolisossomo e é degradado pela enzima heme oxigenase 1 (HO-1). O ferro gerado nessa degradação é estocado na ferritina ou exportado pela ferroportina (FPN1) (DONOVAN et al., 2005). No entanto, se o heme é degradado pela heme oxigenase (HO) em fagolisossomos ou no citosol ainda não foi esclarecido.

O heme e a hemoglobina (Hb) são liberados no plasma durante a destruição de eritrócitos senescentes e enucleação dos eritroblastos. A haptoglobina (Hp) e hemopexina (Hpx) são proteínas plasmáticas responsáveis pela reciclagem do heme. A haptoglobina forma complexos solúveis com os dímeros de hemoglobina e o complexo Hp-Hb liga-se ao receptor CD163 na superfície de macrófagos sendo endocitado (KRISTIANSEN et al., 2001). Já a Hpx liga-se ao heme livre com alta afinidade e os complexos Hpx-Heme são internalizados pelo receptor CD91 principalmente em hepatócitos (HVIDBERG et al., 2005).

Embora o heme seja importante para diversos processos fisiológicos, o excesso desse composto pode ser deletério. O heme livre provoca dano celular e tecidual por amplificar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo (VERCELLOTTI et al., 1994; JENEY et al., 2002). Por conta do seu baixo peso molecular, o heme é lipofílico e intercala-se nas membranas, desestabilizando a bicamada lipídica e as organelas (RYTER & TYRRELL, 2000).

Em concentrações acima de 5 mM, fora de células vermelhas, os tetrâmeros de hemoglobina dissociam-se espontaneamente em dímeros (ROTHER et al., 2005). Na

presença de ROS ou espécies reativas de nitrogênio (RNS), os dímeros de hemoglobina são prontamente oxidados em metahemoglobina (metHb), liberando seu grupamento heme (BALLA et al., 2000). Dessa forma, o heme livre pode ser altamente citotóxico para células endoteliais, um evento patogênico que expõe a matriz protrombótica endotelial para a cascata de coagulação, levando a formação de trombos microvasculares com concomitante vaso-oclusão (BALLA et al., 2000; JENEY et al., 2002).

Muitas doenças autoimunes e hereditárias (como anemia falciforme) são complicadas por hemólise, e os tecidos podem ser subseqüentemente expostos a grandes quantidades de heme livre ou proteínas heme (WAGENER et al., 2003). Esse heme livre pode interferir no recrutamento de leucócitos para os tecidos por diferentes mecanismos: (a) induzindo a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais; (b) aumentando a permeabilidade vascular; (c) aumentando a expressão e secreção de quimiocinas; (d) induzindo a migração de leucócitos, especialmente neutrófilos (GRACA-SOUZA et al., 2002; WAGENER et al., 2003).

Supostamente, qualquer forma de heme livre ou heme-proteína pode agir na reação de Fenton e catalisar a geração de OH^- (RYTER & TYRRELL, 2000). Porto e cols. propuseram que o heme pode estimular a migração de neutrófilos, além da geração de ROS através da ativação de um receptor acoplado à proteína $\text{G}\alpha$, amplificando assim a resposta inflamatória (PORTO et al., 2007). Mais recentemente, autores do mesmo grupo demonstraram que o heme aumenta a letalidade e secreção de citocinas induzida pelo LPS, assim como agonistas para receptores do sistema imune inato (FERNANDEZ et al., 2010).

Sistema heme- heme oxigenase: caracterização e função

O único mecanismo fisiológico de degradação enzimática do grupamento heme é a enzima heme oxigenase (HO). A HO-1 desempenha fundamentalmente dois processos fisiológicos importantes: (1) reciclagem da molécula de ferro dos eritrócitos e (2) manutenção da homeostasia celular em condições de estresse (RYTER et al., 2006).

O entendimento atual do sistema heme-heme oxigenase é que os efeitos biológicos da HO-1 refletem os efeitos dos produtos da degradação do heme. Esse conceito é

corroborado pelos achados que formas clivadas de HO-1 que perderam a atividade enzimática podem exercer atividades biológicas, que incluem citoproteção (LIN et al., 2007) e transcrição de genes associados à mecanismo anti-oxidativos como glutathione peroxidase e catalase (COLLINSON et al., 2010). De todo modo, o catabolismo do heme *per se* é um componente crítico mediando os efeitos biológicos atribuídos à HO-1 e em particular a sua atividade citoprotetora (SOARES & BACH, 2009).

A HO foi originalmente descrita por Tenhune e cols. em 1968. As isoformas de HO podem metabolizar o heme (protoporfirina IX), liberando ferro, monóxido de carbono e biliverdina que é convertida em bilirubina pela biliverdina redutase (TENHUNEN et al., 1968) e é altamente conservada entre as espécies

As HOs estão ancoradas no retículo endoplasmático por uma sequência de aminoácidos na extremidade carboxi-terminal da proteína. A HO é expressa virtualmente em todas as formas de vida, bactérias, fungos, plantas e humanos, regulando uma variedade de processos celulares (TERRY et al., 2002). Em condições fisiológicas normais a maioria das células expressam baixas quantidades de HO-1 (32 kDa), enquanto que HO-2 (36 kDa) é constitutivamente expressa. A expressão da HO-3 ainda não é bem caracterizada. Embora tida como constitutiva, a transcrição de HO-2 pode ser induzida por alguns agentes como opióides e glicocorticóides adrenais (LI & DAVID CLARK, 2000; LIU et al., 2000). De toda forma, a enzima HO-2 confere certo grau de proteção contra o heme livre. No entanto sua expressão não é alterada em resposta ao estresse oxidativo (GOZZELINO et al., 2010).

A expressão de HO-1 é induzida por vários estímulos e envolve várias vias de sinalização celular. O gene que codifica a HO-1, o *Hmox1*, é fortemente induzido por agentes ou condições que aumentam o estresse oxidativo (IMMENSCHUH & RAMADORI, 2000; WAGENER et al., 2003). A expressão de HO-1 é regulada no nível transcricional e pode ser induzida por estímulos que incluem: metais pesados, lipossacarídeos de bactérias, hipoxia, hiperoxia, isquemia, radiação UV, H₂O₂, citocinas, óxido nítrico e o seu próprio substrato, o heme (IMMENSCHUH et al., 2000; OTTERBEIN & CHOI, 2000).

Bach 1 é o repressor transcricional que está ligado a vários elementos responsivos a estresse (STREs) e inibe a transcrição do gene *Hmox1* constitutivamente. A ligação Bach1 aos seus sítios de ligação ao heme resulta em mudanças conformacionais. Em

conseqüência, ocorre o desligamento do repressor Bach 1 da região reguladora e exporte nuclear que resulta na transcrição do gene *Hmox1* (HIRA et al., 2007). De fato, camundongos *knockout* para o a proteína Bach1 expressam constitutivamente altas quantidades de RNA mensageiro para a proteína HO-1 (SUN et al., 2002).

O estresse oxidativo também pode suprimir a atividade da Bach 1, e impedir sua ligação aos STREs. De fato, o desligamento da Bach 1 permite que o fator nuclear responsivo de transcrição (Nrf2) acesse os STREs e induza a transcrição do gene *Hmox1* (ALAM et al., 1999). Sabe-se que, por conta do seu papel pró-oxidante, o heme produzido induz a expressão de HO-1, tanto por promover desligamento do repressor Bach 1 quanto por promover o translocamento do Nrf2. Além disso, várias vias de sinalização independentes do balanço redox estão envolvidos na regulação do gene *Hmox1*, incluindo quinases, proteína quinase C (PKC), proteína quinase A, e fosfatases (ALAM & COOK, 2007).

A HO cliva a molécula de heme e libera biliverdina, monóxido de carbono e ferro. A biliverdina é subseqüentemente convertida em bilirubina pela ação da biliverdina redutase e o ferro livre é prontamente sequestrado pela ferritina (OTTERBEIN & CHOI, 2000) (**Figura 4**):

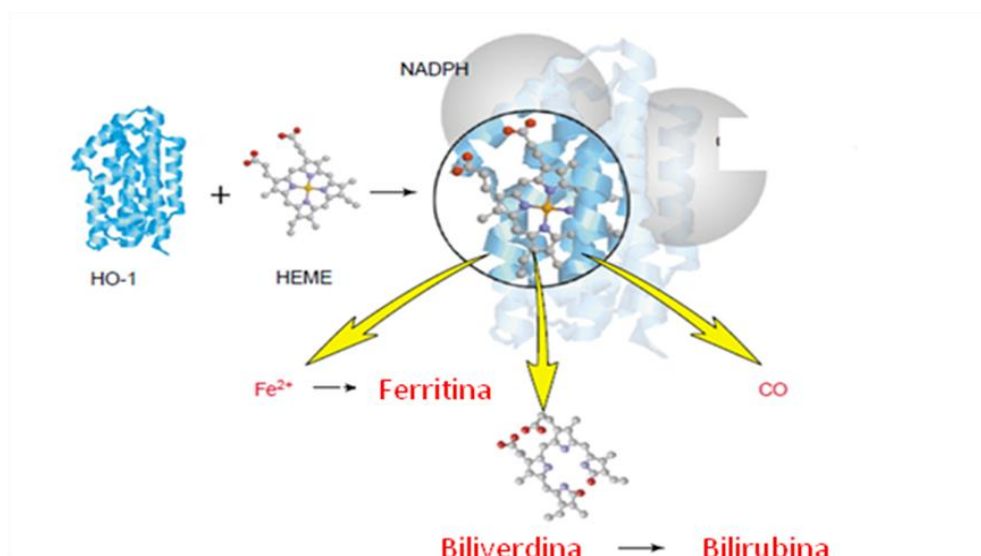


Figura 4- Degradação do heme pela HO-1

Adaptado de Otterbein & Soares, 2003

Além do seu papel anti-inflamatório, a HO tem um papel importante na reciclagem de ferro feita por macrófagos, principalmente do sistema retículo endotelial. Apenas 10% do ferro necessário são adquiridos na absorção intestinal, o resto é fornecido por macrófagos que reciclam o ferro do heme internamente (HENTZE et al., 2010). Macrófagos fagocitam eritrócitos senescentes e catabolizam heme utilizando a HO-1, enquanto o ferro resultante dessa degradação é exportado das membranas fagolisossomais para o meio extracelular (SOE-LIN et al., 2009).

HO-1 é considerada uma proteína protetora com potente efeito anti-inflamatório, antioxidante e anti-proliferativo. A HO-1 é expressa no fígado, baço, pâncreas, intestino, rim, coração, retina, próstata, pulmão, pele, cérebro e células endoteliais (EXNER et al., 2004).

No entanto, humanos diferem consideravelmente na sua habilidade de montar uma resposta de aumento de expressão de HO-1. Dois polimorfismos na região promotora do gene codificante para HO-1 já foram relatadas na modulação da quantidade de HO-1 em resposta a um estímulo dado (YAMADA et al., 2000). Muitos estudos têm demonstrado que a habilidade dos pacientes, com certos genótipos, de responder fortemente em termos de aumentar a expressão de HO-1 pode ser um importante fator protetor ou preditor de gravidade (HIRAI et al., 2003; ONO et al., 2003).

Muitos estudos têm associado a HO-1 a propriedades anti-inflamatórias. Essa descrição tem sido corroborada pelo fato de que camundongos deficientes no gene *Hmox1* desenvolvem um estado crônico de inflamação. Há um relato de caso de um ser humano com deficiência na atividade da enzima HO-1, esse indivíduo tinha anemia hemolítica, altas quantidades de heme e morreu de síndrome inflamatória (YACHIE et al., 1999).

Papel da HO-1 e do heme em doenças infecciosas

A participação da enzima HO-1 já foi descrita em diversas doenças infecciosas e seu efeito está essencialmente relacionado no balanço entre os mediadores pró e anti-inflamatórios durante a infecção. Em um modelo de endotoxemia, camundongos *knockout* no gene *Hmox1* têm maior mortalidade, estresse oxidativo e dano tecidual quando expostos

a bactérias Gram-negativas (WIESEL et al., 2000). Em contraste a esse efeito, a administração de sub-produtos da ação da HO-1 como CO ou biliverdina-bilirubina reduz a inflamação e atenua o dano aos órgãos nos animais infectados (OTTERBEIN et al., 2000; RYTER et al., 2006). Esses e outros estudos indicam os efeitos benéficos da HO-1 e seus produtos durante processos inflamatórios e infecciosos.

Em relação às infecções bacterianas, camundongos *knockout* no gene *Hmox1* têm menor taxa de sobrevivência quando submetidos à um modelo de sepse que consiste na perfuração e ligação do ceco (CLP) (CHUNG et al., 2008; LARSEN et al., 2010). Recentemente, Larsen e cols. (2010) demonstraram que os efeitos protetores da HO-1 na sepse por CLP são proporcionados pela capacidade da HO-1 de prevenir o dano tecidual provocado pelo heme liberado da hemoglobina durante a infecção. Além disso, os autores exploraram o papel da hemopexina (Hpx) na proteção contra os efeitos tóxicos do heme na sepse, de forma que a administração de Hpx protege do dano tecidual e da letalidade. Por fim, os autores descreveram que pacientes que não sobreviveram à sepse tinham menores quantidades de Hpx no soro (LARSEN et al., 2010).

Ainda entre as infecções bacterianas, a *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) destaca-se por provocar um dos maiores problemas de saúde pública, a tuberculose (WHO, 2010). A MTB expressa uma série de genes conhecidos como reguladores da dormência. Foi demonstrado que a HO-1 é induzida em macrófagos infectados com MTB *ex vivo* e *in vivo* e o CO é bem tolerado pela MTB (KUMAR et al., 2008; SHILOH et al., 2008). Mais relevante ainda, os autores demonstraram que o CO induz dormência em MTB, sendo que na ausência de HO-1, os genes de dormência não são suprimidos. Esses resultados levaram à proposição da hipótese de que quando a MTB estabelece sua infecção latente, o organismo induz uma resposta imune que resulta na indução de HO-1 e formação de granuloma. Consequentemente, a MTB é exposta a HO-1 e CO e menores quantidades de oxigênio no granuloma, o que ativa a dormência e permite sobrevivência do organismo (CHUNG et al., 2009).

Os fungos tem o potencial de serem patogênicos. Por exemplo, a *Candida albicans*, em situações de baixa da resposta imune, pode se tornar um patógeno invasivo que coloniza o hospedeiro, levando à doença disseminada, que está associada com alta mortalidade (PENDRAK et al., 2004). No referido artigo, os autores demonstraram que quando *C. albicans* é exposta à hemoglobina há aumento dos receptores de fibronectina,

levando a adesão às células vasculares do hospedeiro vertebrado ou tecidos específicos do hospedeiro. Dessa forma, os autores propuseram a hipótese de que a hemoglobina pode ser um fator do hospedeiro que leva à infecção disseminada por *C. albicans*. Pendrak e cols. (2004) ainda discutiram que como a biliverdina protege dos efeitos fungicidas do macrófago como o estresse oxidativo, e o CO e a HO-1 têm propriedades anti-inflamatórias, a HO-1 pode trazer outras vantagens para a *C. albicans* como patógeno oportunista no hospedeiro (PENDRAK et al., 2004).

Em relação às infecções virais, as hepatites representam uma das causas mais comuns de doença hepática. Por conta do seu papel na resolução da inflamação, a HO-1 pode proteger o fígado das conseqüências deletérias da resposta imune do hospedeiro contra o vírus da hepatite B (HBV). Em um modelo murino de infecção aguda por HBV, Protzer e cols. (2007) demonstraram que a indução de HO-1 protege o fígado do dano tecidual decorrente da infecção por HBV por uma atividade antiviral do hospedeiro. Os autores ainda evidenciaram que a indução de HO-1 pela Cobalto Protoporfirina (CoPP) ou por um adenovírus resultou em uma atividade anti-viral, agindo na replicação do HBV, além dos efeitos anti-inflamatórios (PROTZER et al., 2007).

Devadas & Dhawan (2006) investigaram as conseqüências biológicas da indução farmacológica de HO-1, utilizando heme como mecanismo de defesa do hospedeiro contra a infecção por HIV. Em monócitos e células T humanas, a indução de HO-1 resulta em menor infectividade e supressão da replicação do HIV (DEVADAS & DHAWAN, 2006). Além disso, uma das drogas utilizadas no tratamento contra AIDS, o inibidor de protease Rotinavir, parece ter seu efeito mediado parcialmente pela indução de HO-1 (MUHL et al., 2004).

Papel da HO-1 em doenças infecciosas parasitárias

Em se tratando de doenças parasitárias, um modelo bastante estudado é o da malária, no qual a expressão de HO-1 interfere na resolução da doença (FERREIRA et al., 2008). A infecção pelo *Plasmodium*, tanto em humanos quanto em camundongos, está associada com a indução de altas quantidades de HO-1 (SCHLUESENER et al., 2001). Há um aumento de expressão de HO-1 em lesões cerebrais de pacientes com malária, assim como na micróglia próxima às áreas de hemorragia (SCHLUESENER et al., 2001). Além

disso, a infecção experimental de camundongos por diferentes espécies de *Plasmodium* aumenta a expressão de HO-1 no cérebro e fígado desses animais (EPIPHANIO et al., 2008; SEIXAS et al., 2009). Camundongos Balb/c expressam maiores quantidades de HO-1 quando comparados à linhagem C57BL/6. Isso contribui para a susceptibilidade da linhagem C57BL/6 ao desenvolvimento da malária cerebral experimental quando infectados pelo *P. berghei* (PAMPLONA et al., 2007).

No estudo do papel da HO-1 em um modelo murino experimental de malária cerebral, Pamplona e cols demonstraram em 2007 que a HO-1 e seu subproduto monóxido de carbono evitam o rompimento da barreira hemato-encefálica e a consequente congestão microvascular, hemorragia e neuroinflamação visto nos estágios eritrocíticos e sanguíneos da infecção por *Plasmodium* (PAMPLONA et al., 2007). O efeito protetor da HO-1 ou CO foi atribuído à ligação com a hemoglobina livre, suprimindo assim a acumulação de heme na circulação e no cérebro o que é deletério ao hospedeiro infectado (JENEY et al., 2002).

Epiphanio e cols. (2008) demonstraram que a infecção por *Plasmodium* no fígado induz a expressão de HO-1, que serve para proteger hepatócitos infectados, promovendo assim a fase hepática da infecção. Em contraste aos efeitos benéficos para o hospedeiro no modelo experimental de malária cerebral, a indução de HO-1 serve como um estágio obrigatório no estabelecimento da fase hepática, por controlar a resposta imune do hospedeiro e proteger hepatócitos infectados (EPIPHANIO et al., 2008). Dessa forma, existe uma significativa diferença no papel da HO-1 dependendo do estágio da doença.

Os mesmos autores do referido artigo explanaram que a indução de HO-1 por um adenovírus aumenta a carga parasitária de hepatócitos infectados com *P. berghei*. Da mesma forma, a inibição de HO-1 *in vivo* reduz a replicação do parasito circulante no sangue, bem como no fígado.

Mais recentemente, Seixas e cols. (2009) demonstraram que a HO-1 é protetora também na forma não cerebral da malária. Sabe-se que o TNF desempenha um papel deletério nas diversas formas de malária grave (SINHA et al., 2008; ANDRADE et al., 2010b). Quando infectados por *P. chabaudi*, camundongos têm altas concentrações de TNF e heme livre no plasma, desenvolvendo uma forma letal de falência hepática associada com morte celular disseminada. A neutralização de TNF (com anticorpo) ou do heme (pela

indução de HO-1) protege hepatócitos de sofrer morte celular e suprime a falência hepática em um modelo experimental de malária (SEIXAS et al., 2009).

JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral apresenta uma série de alterações hematológicas cujos mecanismos imunopatogênicos ainda são pouco esclarecidos. Um estudo recente demonstrou, utilizando ferramentas de *microarray*, que o gene *Hmox1* é um dos genes induzidos no contexto da infecção de macrófagos humanos e células THP-1 por *L. donovani* (EL FADILI et al., 2008). Nesse sentido, a enzima heme oxigenase-1 pode ter um envolvimento nas infecções por *Leishmania* do complexo *L. donovani*, inclusive a *L. chagasi* (responsável pelos casos da forma visceral no Brasil). Por se tratar de uma parasitemia sistêmica visceralizante associada à hemólise e conseqüente liberação de heme, a enzima HO-1 pode ter participação na modulação da carga parasitária bem como na proteção aos efeitos tóxicos do heme.

Sabe-se que a infecção de macrófagos com promastigotas e amastigotas de *Leishmania* resulta na produção de superóxido (MILLER et al., 2000; GANTT et al., 2001). Pham e cols. (2005) demonstraram que amastigotas de *Leishmania* possuem estratégias para evitar a produção de radicais de oxigênio, e que esse fenômeno ocorre na dependência da ativação da enzima HO-1. Amastigotas de *Leishmania pifanoi* inviabilizam a formação do complexo NADPH (uma enzima que contém grupamento heme) no vacúolo parasitóforo, via ativação da enzima HO-1, o que resulta na degradação do heme e impede a formação do polipeptídeo intermediário que compõe a enzima NADPH oxidase, molécula de intensa atividade leishmanicida (PHAM et al., 2005).

No entanto, ambos os estudos não exploraram quais as conseqüências da ativação da HO-1 na replicação intracelular da *Leishmania* e quais mecanismos imunoregulatórios são deflagrados na célula hospedeira.

Portanto, nesse trabalho nossa hipótese é de que a ativação da enzima heme oxigenase-1 favorece a infecção por *Leishmania chagasi* em macrófagos murinos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

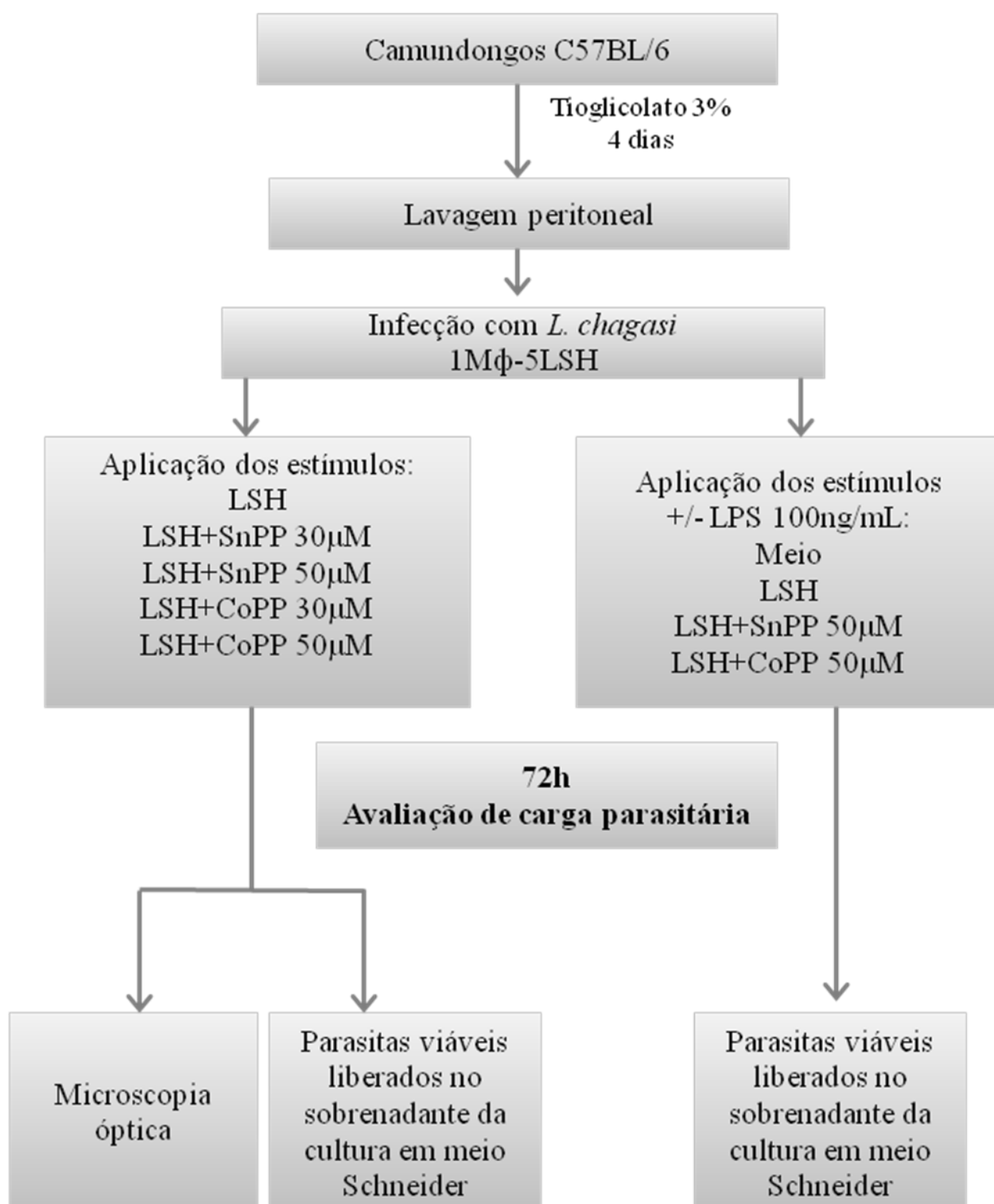
Avaliar o papel da heme oxigenase-1 (HO-1) na infecção por *L. chagasi* em macrófagos murinos.

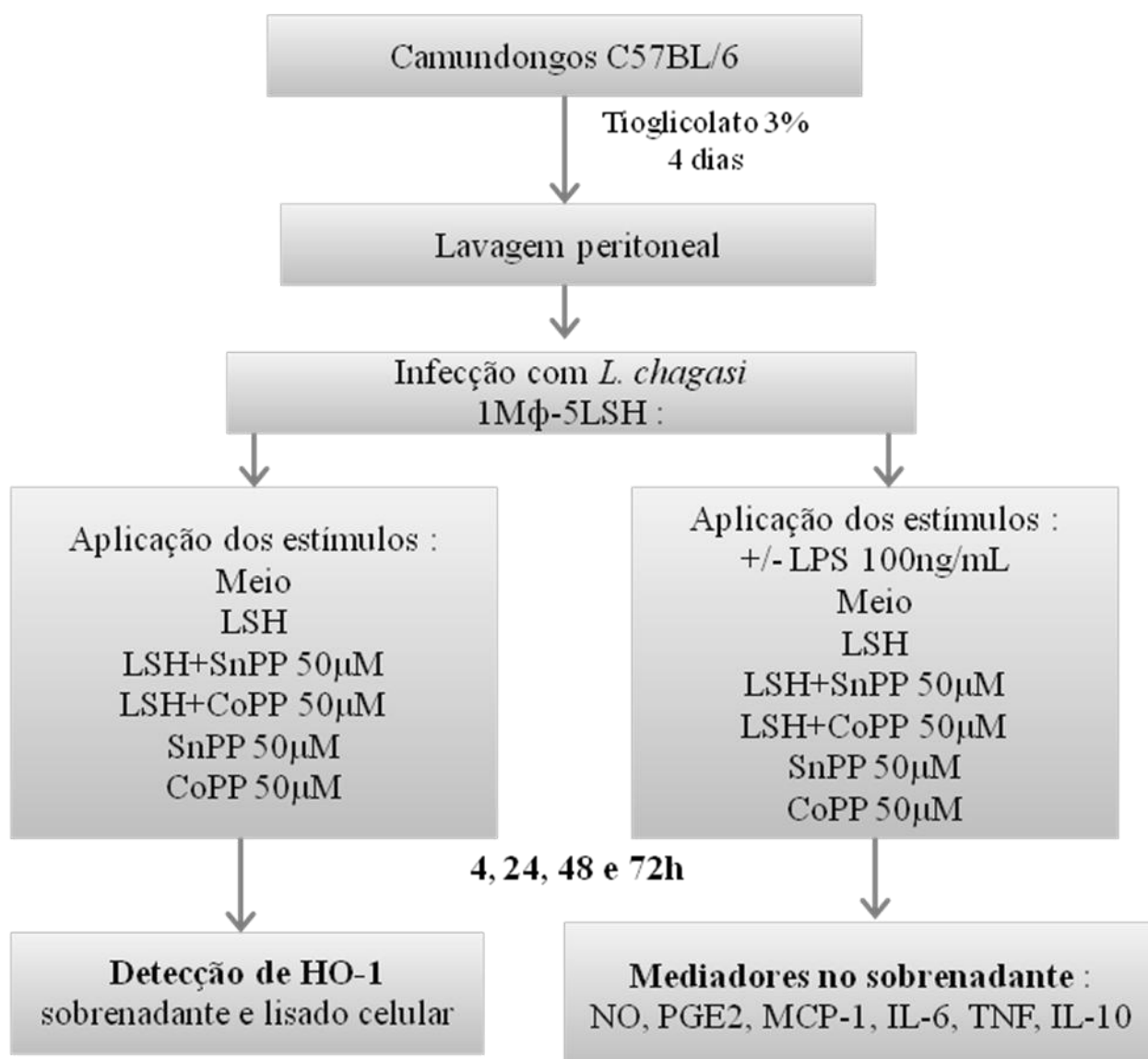
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da infecção por *L. chagasi* na alteração das concentrações da proteína HO-1 em macrófagos;
- Investigar papel da HO-1 na infecção por *L. chagasi*, utilizando drogas inibidoras/ativadoras da expressão e atividade da enzima;
- Averiguar a relevância do gene *Hmox1* da célula hospedeira na infecção por *L. chagasi*, utilizando macrófagos *knockout* para o gene;
- Avaliar a produção por macrófagos de mediadores pró e anti-inflamatórios na infecção por *L. chagasi*, bem como frente à estimulação por LPS e tratamento com a droga indutora da HO-1

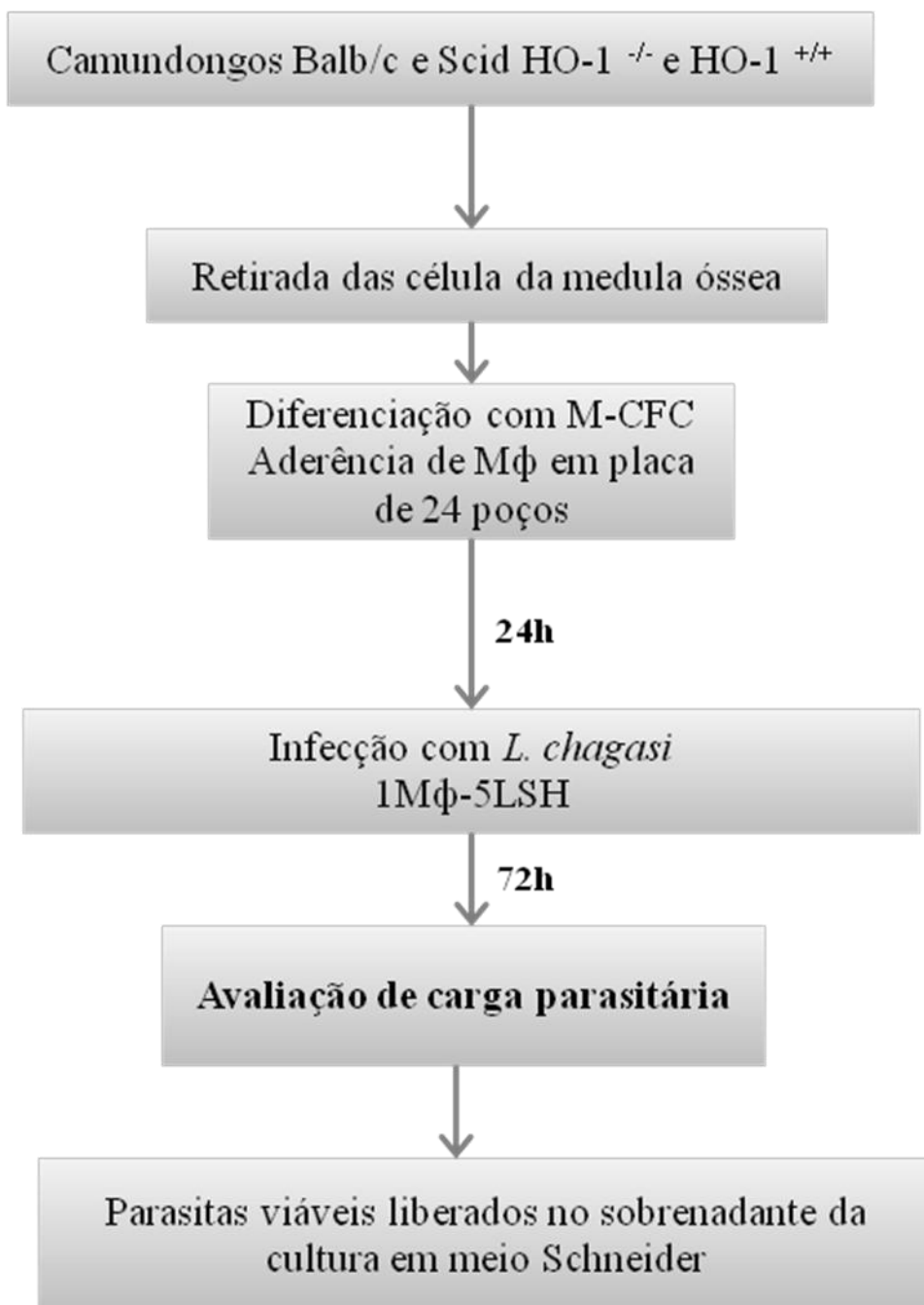
DESENHO EXPERIMENTAL

Abordagem experimental I: Avaliação da carga parasitária



Abordagem experimental II: Avaliação de mediadores

Abordagem experimental III: Avaliação da carga parasitária em macrófagos knockout no gene *Hmox1*



MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Camundongos C57BL/6, machos (8-10 semanas), foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ). Todos os procedimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Utilização de Animais de Laboratório (CEUA) do CPqGM – FIOCRUZ, liberado sob número de licença L-IGM-024/09 no projeto intitulado- “Papel da enzima heme oxigenase (HO-1) na resposta à infecção por *Leishmania chagasi*”.

Parasita

Promastigotas de *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/89/BA262) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma, STF. Louis, MO, EUA) suplementado com soro bovino fetal 20 % (LGC, Brasil), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml e streptomomicina 100 µg/mL (Sigma, St. Louis, MO, EUA), à 23 °C. Em todos os experimentos foram utilizados parasitos em fase estacionária do cultivo.

Manipulação farmacológica da enzima Heme Oxigenase -1 (HO-1)

Estanho Protoporfirina IX (SnPP), inibidor da HO-1 e, Cobalto Protoporfirina IX (CoPP) ativador da HO-1, foram obtidos comercialmente da Frontier Scientific (Logan, UT, USA). As protoporfirinas foram diluídas imediatamente antes do uso em NaOH 0,1N e meio RPMI (Gibco, Carsbad, CA, USA) e ajustadas para as concentrações 30 µM ou 50µM.

Controle de citotoxicidade das protoporfirinas sobre macrófagos peritoneais e promastigotas de *L. chagasi*

A citotoxicidade das protoporfirinas foi avaliada *in vitro* utilizando o método XTT segundo instruções do fabricante (Cell Proliferation and viability Kit II –XTT, Roche, Mannheim, Germany). A técnica consiste em incubar as células com sais de tetrazólio que é reduzido a formazano pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima ativa somente em células com metabolismo e cadeia respiratória intactos. O formazano é quantificado

fotometricamente e está relacionado com o número de células viáveis. Para avaliação da citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, 5×10^5 células foram incubados em placa de 96 poços fundo chato com meio RPMI, SnPP 50 μ M ou CoPP50 μ M, por 4, 24 e 48 horas. Após o tempo de incubação com os estímulos, o meio das culturas foi substituído pela solução do kit XTT diluída em meio RPMI e a placa foi novamente incubada na estufa por 18 horas. Para avaliação da citotoxicidade sobre os parasitas, 1×10^6 promastigotas de *L. chagasi* foram incubadas com meio RPMI sem protoporfirinas, SnPP ou CoPP nas concentrações de 30 e 50 μ M, por 4 horas à 37 °C e 5% de CO₂ que corresponde ao período que as promastigotas ficam em contato com as protoporfirinas nos ensaios *in vitro*. Em seguida, o meio da cultura foi substituído pela solução do kit diluída em meio Schneider e a placa foi incubada na estufa BOD à 23 °C por 18 horas. A reação para ambos os testes foi lida no espectrofotômetro a 450nm.

Observamos que as protoporfirinas utilizadas não tiveram efeito tóxico sobre macrófagos peritoneais no tempo de 4 horas (Fig. 5A). Resultado idêntico foi observado para os tempos de 24 e 48 hr (dados não mostrados). A viabilidade de formas promastigotas de *L. chagasi* também não foi afetada pela presença de protoporfirinas em ambas as concentrações testadas (Fig. 5B).

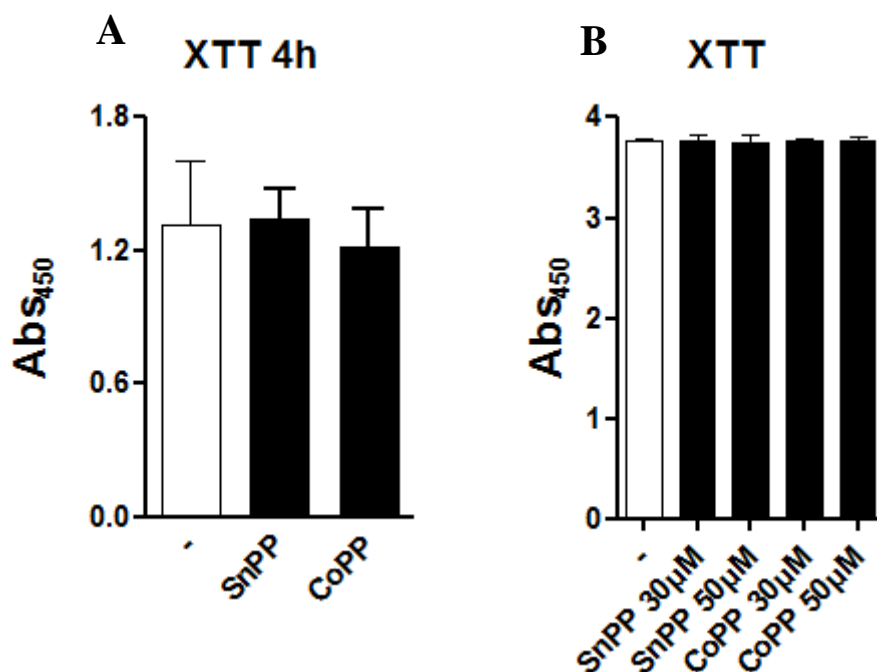


Figura 5. Falta de toxicidade das protoporfirinas SnPP e CoPP sobre macrófagos (A) e promastigotas de *L. chagasi* (B). Os valores representam a média \pm SD da Absorbância

(Abs) a 450nm, de um experimento representativo de 3 experimentos independentes, em A (n=5 animais por grupo), em B, o experimento foi feito em quadruplicada. Os grupos experimentais foram comparados pelo teste One-way ANOVA Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's.

Obtenção de macrófagos peritoneais e infecção *in vitro*

Para a obtenção de macrófagos foram injetados 2 mL de tioglicolato (Difco, Detroit, MI, USA) a 3% na cavidade intraperitoneal de camundongos C57BL/6. Após 96 horas os animais foram eutanaziados e o peritônio lavado com 8 mL de RPMI 1640 estéril para a coleta do exudato leucocitário. O lavado peritoneal foi plaqueado sobre lamínulas estéreis na concentração de 2×10^5 células/poço em placa de 24 poços. Após 2 horas de incubação a 37°C, 5% CO₂, as monocamadas foram lavadas para remoção de células não aderentes.

Avaliação da carga parasitária *in vitro*

Macrófagos foram infectados com formas promastigotas estacionárias de *L. chagasi* na proporção de 1 MΦ: 5 parasitos na presença do inibidor (SnPP) ou ativador (CoPP) da HO-1 em diferentes concentrações. Após 4 horas de infecção as culturas foram lavadas com salina apirogênica para a retirada dos parasitos não internalizados e o meio contendo as drogas foi repostado nas culturas. Após 72 horas de interação com os estímulos as lamínulas foram fixadas em metanol e coradas com Diff-quick. Realizamos uma contagem cega de 200 células em microscópio óptico para a quantificação do percentual de macrófagos infectados, bem como a quantidade de amastigota por macrófagos. Os resultados estão mostrados como percentual de macrófagos infectados e amastigotas por 100 macrófagos, ambos os parâmetros estão mostrado como percentual em relação ao controle (grupo infectado apenas com LSH). Além da quantificação da carga parasitária por microscopia óptica, fizemos a leitura dos parasitos viáveis utilizando o método do Schneider adaptado de Ribeiro-Gomes e col. (RIBEIRO-GOMES et al., 2004). Brevemente, macrófagos foram infectados e tratados com os mesmo estímulos descritos acima em placa de 24 poços sem lamínula. Após 72 horas de infecção o meio das culturas foi trocado por meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 20% FBS, 2

mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA). A placa foi então deixada na BOD à 23 °C. As formas promastigotas liberadas no sobrenadante dessas culturas foram contadas em câmara de Neubauer 4, 5, 6, e 7 dias após a troca do meio por Schneider.

Macrófagos estimulados com 100 ng/mL de LPS foram infectados com formas promastigotas estacionárias de *L. chagasi* na proporção de 1 MΦ: 5 parasitos na presença do inibidor (50 uM SnPP) ou ativador (50uM CoPP) da HO-1. A avaliação da carga parasitária foi feita pela contagem de promastigotas viáveis em meio Schneider, como descrito acima.

Ensaio de infecção de macrófagos peritoneais com *L. chagasi* para dosagem dos mediadores

Células do lavado peritoneal foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placa de 48, sem a presença de lamínulas. Após 2 horas de incubação a 37°C, 5% CO₂, as monocamadas foram lavadas para remoção de células não aderentes. Macrófagos foram infectados com formas promastigotas estacionárias de *L. chagasi* na proporção de 1 MΦ: 5 parasitos na presença do inibidor (SnPP 50µM) ou ativador (CoPP 50µM) da HO-1 e/ou LPS a 100ng/mL (Calbiochem, Behring Diagnostics, La Jolla, CA, USA). Após 4 horas de infecção as culturas foram lavadas com salina apirogênica para a retirada dos parasitos não internalizados e o meio contendo as drogas foi repostado nas culturas. Após 4, 24, 48 e 72 horas de interação com os estímulos, o sobrenadante foi coletado, centrifugado e armazenado a -20°C para a mensuração dos mediadores, citocinas e quimiocinas. As células contidas nos poços dessas placas foram lisadas com o tampão de lise do kit de HO-1 (Takara). Em seguida, o lisado obtido foi centrifugado e armazenado a -20°C até sua utilização.

Deteção de HO-1 no sobrenadante e lisado celular

A proteína HO-1 foi detectado no sobrenadante e lisado de cultura de macrófagos infectados por *L. chagasi* juntamente com SnPP ou CoPP. A HO-1 foi detectada por um kit colorimétrico comercial, utilizado de acordo com as especificações do fabricante (Takara). Resumidamente: o kit fornece uma placa pré-sensibilizada com anticorpo anti-HO-1 bloqueado para ligações inespecíficas. Amostras e padrões foram adicionados à placa ao

mesmo instante que o anticorpo biotilado conjugado. Durante a incubação a HO-1 produzida se liga ao anticorpo anti-HO-1 biotilado. Após a lavagem com PBS contendo 0,1% de Tween20, a streptoavidina peroxidase e TMB (tetrametilbenzidina) foram adicionados ao substrato (H_2O_2). Essa reação resulta no desenvolvimento de cor com intensidade proporcional à quantidade de HO-1 presente na amostra, a reação é lida a 450nm em um leitor de placa (espectrofotômetro). A concentração de HO-1 nas amostras pode ser determinada pela comparação com a curva padrão. As amostras de lisado celular foram diluídas a 1:10 no tampão de diluição das amostras (*sample buffer*) para que todas as amostras ficassem no espectro de detecção da curva padrão.

Detecção de citocinas e quimiocinas

Os sobrenadantes correspondentes a 4, 24, 48 e 72 horas de interação com os estímulos nas culturas de macrófagos infectados com *L. chagasi* e estimulados com LPS foram avaliados para a mensuração da produção de IL-6, MCP-1, TNF e IL-10 usando o kit inflamatório murino de Cytometric Bead Array (CBA) BD Bioscience (San Diego, CA, USA). CBA é uma metodologia que mensura simultaneamente múltiplas citocinas e quimiocina em uma amostra. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD e as aquisições analisadas no software Cell Quest. A dosagem de IL-1 β foi realizada no sobrenadante de macrófagos cultivados em placa de 48 poços estimulados com LPS por 24 horas. Utilizamos o kit IL-1 β ELISA Ready-SET-GO de acordo com as especificações do fabricante (eBioscience, San Diego, CA, USA).

ELISA para detecção de prostaglandina E2 (PGE-2)

A dosagem de PGE2 foi realizada no sobrenadante de macrófagos cultivados em placa de 48 poços estimulados com LPS por 24 horas. O kit utiliza a técnica de EIA (Enzyme Immuneassay) como indicado pelo fabricante do kit de dosagem Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

Detecção de óxido nítrico (NO)

A dosagem de NO foi realizada no sobrenadante de macrófagos cultivados em placa de 48 poços estimulados com LPS por 24 e 48 horas. O sobrenadante dessas culturas foi avaliado para a produção de NO pela mensuração de nitrito, seu produto estável, através da reação

de Griess. A concentração de nitrito foi determinada pela leitura da absorbância a 550 nm em comparação com a curva padrão.

Ensaio com macrófagos derivados de medula óssea de camundongos deficientes no gene *Hmox1*

Para descartar o efeito da interferência das drogas na via de indução ou inibição da HO-1 utilizamos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagem (*Hmox1*^{+/+}) e deficientes no gene *Hmox1* (*Hmox1*^{-/-}). Para a maturação de macrófagos, os precursores mononucleares de medula óssea de camundongos *Hmox*^{+/+} e *Hmox*^{-/-} foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com 30% de sobrenadante de cultura de L-929 (fonte de M-CFC), 20% soro bovino fetal, L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml) a 37 °C e 5% de CO₂ de 6 a 7 dias. Para os ensaios de carga parasitária foram plaqueadas 2x10⁵ células por poço em placa de 24 poços. Após 24 horas em estufa as células foram infectadas com formas promastigotas de *L. chagasi*. Nesses ensaios a carga parasitária foi avaliada pelo método Schneider como descrito acima.

Análise estatística

Os dados obtidos foram representados como média ± desvio padrão (SD) da média e analisados pelo teste não paramétrico One-way ANOVA Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's, com nível de significância $p < 0.05$. Em alguns experimentos o teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos estimulados em relação ao grupo controle. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$. As análises foram feitas no GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA). Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes no mínimo em quadruplicata para cada grupo experimental.

RESULTADOS

Indução da HO-1 na infecção de macrófagos por L. chagasi

O efeito da infecção por *L. chagasi* sobre a produção de HO-1 *in vitro* foi investigado usando macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 elicitados por tioglicolato. A produção da proteína HO-1 foi avaliada no sobrenadante e no lisado celular 4, 24, 48 e 72 horas após interação dos macrófagos com formas promastigotas do parasita ou apenas com meio. A análise da proteína HO-1 por ELISA revelou que a *L. chagasi* induziu a liberação de HO-1 no sobrenadante das culturas (Fig. 6A), bem como a presença da proteína nos macrófagos (Fig 6B) quando comparado ao grupo tratado apenas com meio. Essa diferença foi detectada à partir de 24h de interação se mantendo até 72 horas.

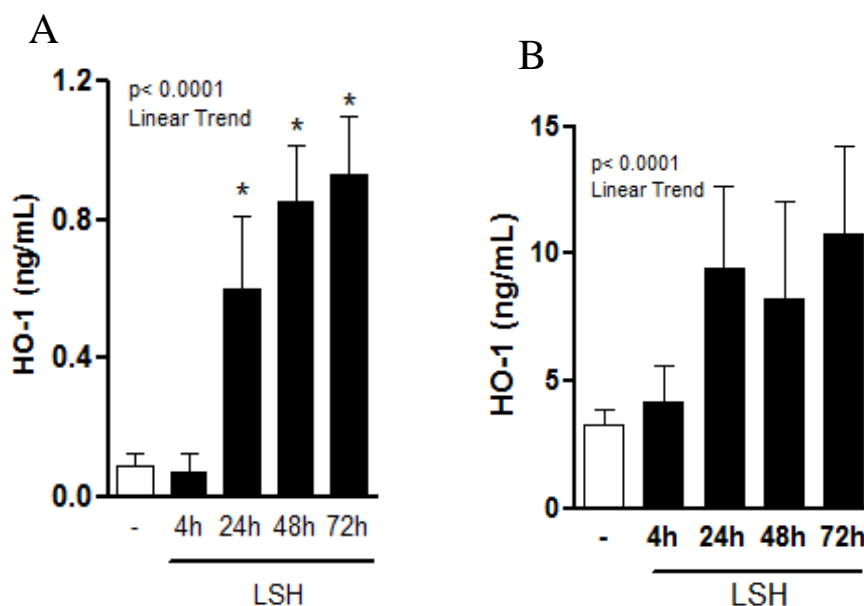


Figura 6. Infecção por *L. chagasi* induz a proteína HO-1. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi*. A proteína HO-1 foi analisada no sobrenadante e lisado celular 4h, 24h, 48h e 72h após interação com os estímulos por um kit imunoenzimático (ELISA). Os valores representam a média \pm SD de um experimento representativo de 3 experimentos independentes (n=5 animais por grupo). * p < 0.001 indica diferença significativa pelo teste paramétrico ANOVA com teste de tendência linear (*Linear Trend*) em relação ao controle meio.

Modulação farmacológica da liberação de HO-1 na presença de SnPP e CoPP em macrófagos infectados com L. chagasi

A partir da observação de que a infecção por *L. chagasi* é capaz de aumentar os níveis da proteína HO-1 e considerando que a Estanho protoporfirina IX (SnPP) e Cobalto protoporfirina IX (CoPP) estão envolvidas na inibição da atividade e indução da expressão da HO-1, respectivamente (DA SILVA et al., 1994) (SHAN et al., 2006), resolvemos avaliar o papel direto dessas protoporfirinas na liberação de HO-1.

Culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* e cultivados na ausência ou presença de SnPP 50 μ M ou CoPP 50 μ M. Após 4, 24, 48 e 72 horas o sobrenadante foi coletado e avaliado para a liberação de HO-1. Novamente confirmamos o aumento na liberação de HO-1 na infecção por *L. chagasi* como mostrado na Fig. 7A. Além disso, observamos que esse efeito foi inibido em presença de SnPP, enquanto que o tratamento com CoPP exacerbou a liberação de HO-1 na infecção por *L. chagasi* (Fig. 7A). Grupos controles de macrófagos não infectados tratados apenas com SnPP 50 μ M ou CoPP 50 μ M são mostrados no gráfico de cinética acompanhando o efeito da modulação da HO-1. Os efeitos durante a infecção por *L. chagasi* de inibição pelo SnPP (Fig. 7C) e o de ativação pelo CoPP (Fig. 7B) foram mais bem evidenciados pela análise de Área sob a curva (AUC) que considera todos os pontos da cinética de liberação de HO-1 (Fig. 7B e C).

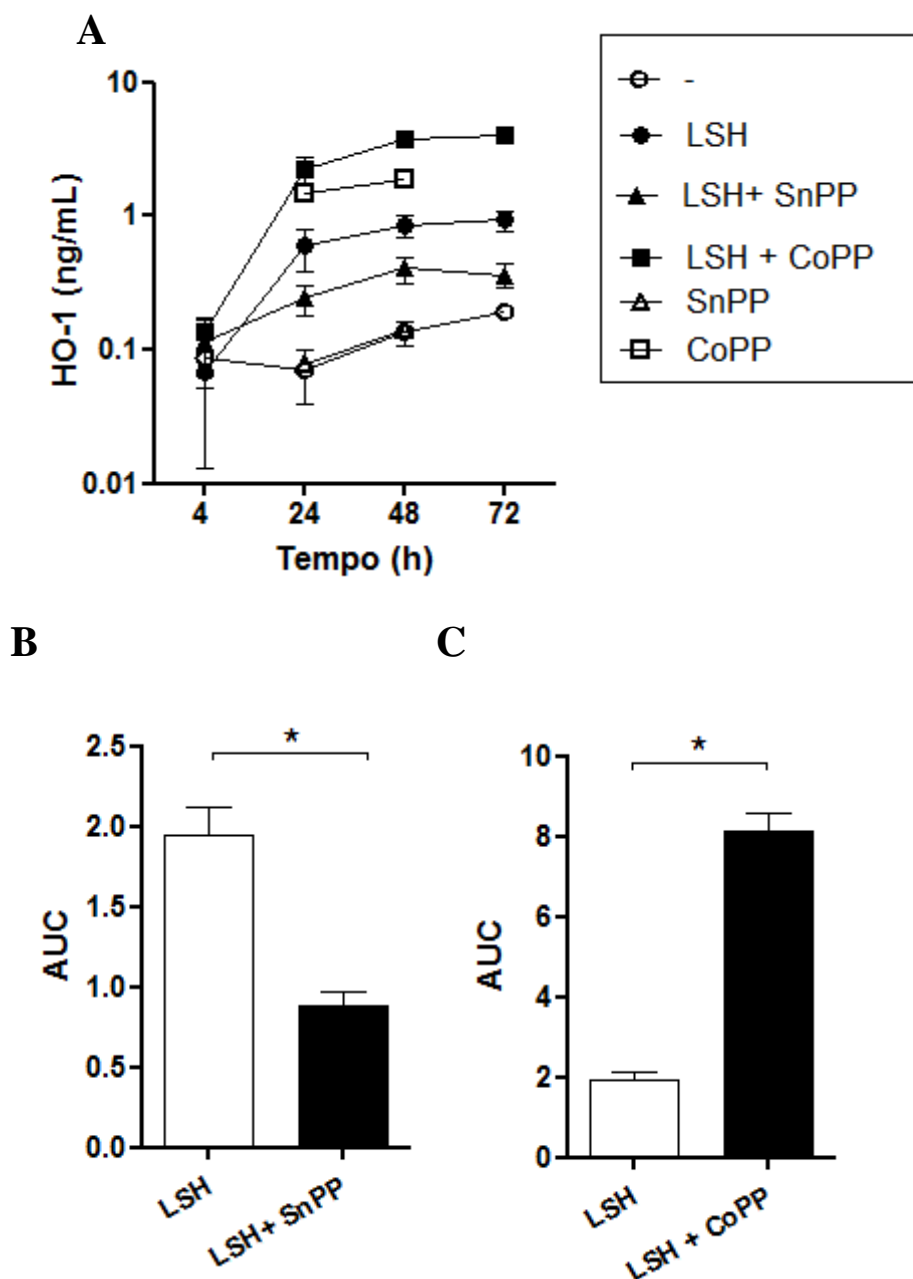


Figura 7. A droga indutora da HO-1, CoPP induz aumento na liberação da proteína HO-1, enquanto que a droga inibidora, SnPP, reduz esse efeito. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de 50 μ M SnPP ou 50 μ M.CoPP. HO-1 liberada no sobrenadante dessas culturas foi avaliado por ELISA 4h, 24h, 48h e 72h após interação com os estímulos. (A) Cinética da liberação de HO-1 em resposta aos diferentes estímulos. (B e C) Comparação da área sob a curva (AUC) entre o grupo macrófagos infectados com *L. chagasi* apenas e tratados com SnPP (B) ou CoPP (C). Os valores representam a média \pm SD de um experimento representativo de 3 experimentos independentes (n=5 animais por grupo). * $p < 0.05$ indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Mann-Whitney, quando comparando macrófagos infectados com *L. chagasi*.

Interferência na carga parasitária em presença das drogas moduladoras da atividade e expressão da HO-1

À partir das observações de que a liberação de HO-1 induzida pela infecção de macrófagos por *L. chagasi* foi exacerbada em presença de CoPP, enquanto que o SnPP reverte esse efeito, nosso próximo passo foi avaliar o efeito dessas drogas na carga parasitária. Para isso, nós infectamos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* na presença de SnPP ou CoPP nas concentrações de 30 μ M e 50 μ M. Nós avaliamos a carga parasitária 72 horas após infecção segundo os parâmetros de percentual de macrófagos infectados e quantidade de amastigota por macrófagos por microscopia óptica. Um aumento significativo no percentual de macrófagos infectados (Fig. 8A) e no número de amastigotas por 100 macrófagos (Fig 8B) foi observado no tratamento com CoPP 50 μ M, , enquanto que o tratamento com SnPP não alterou os parâmetros de carga parasitária em ambas as doses testadas (Fig. 8A e 8B). Esse dado foi corroborado pela avaliação da carga parasitária por outro método que consiste na contagem das formas promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados após 72hr. Observamos um aumento do número de parasitas viáveis no grupo tratado com CoPP 50 μ M e novamente, o tratamento com SnPP 50 μ M não alterou a carga parasitária (Fig. 8C). Esses resultados sugerem um possível mecanismo anti-leishmanicida deflagrados pela ativação de HO-1 e que são aumentados em presença CoPP que favorece a replicação do parasita na célula hospedeira.

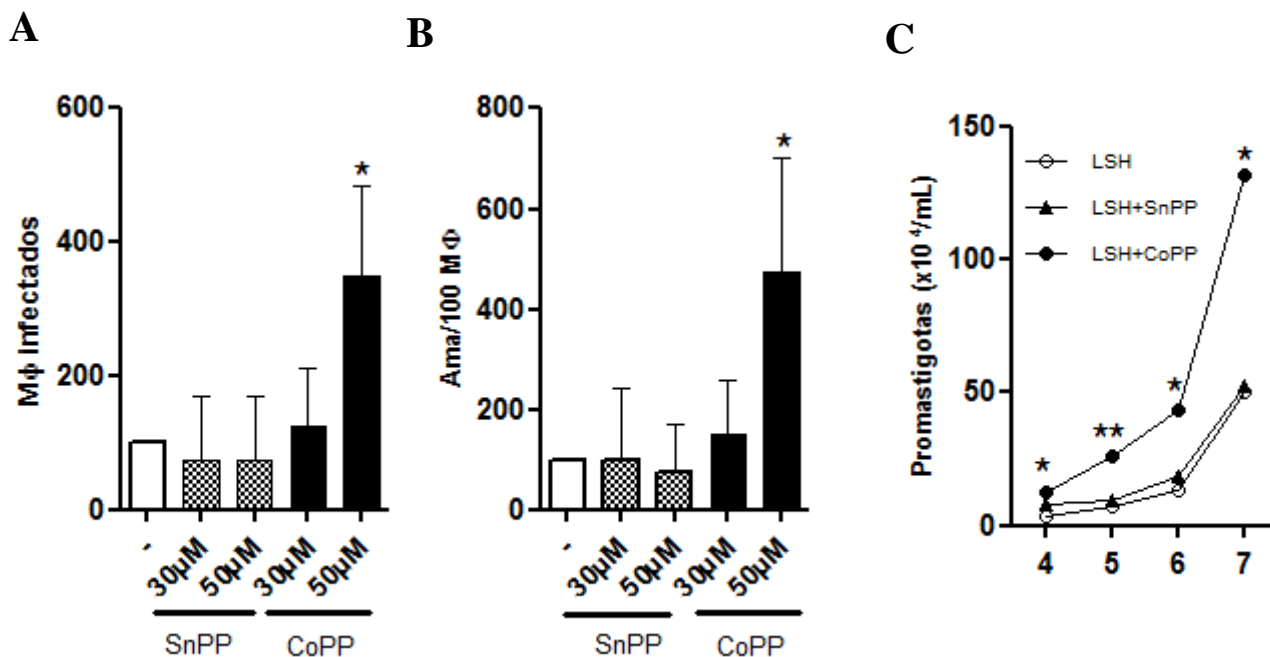


Figura 8. CoPP aumenta a carga parasitária na infecção por *L. chagasi*, enquanto que o SnPP não interfere na proliferação dos parasita. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP ou SnPP nas concentrações de 30 μM e 50 μM. A carga parasitária foi avaliada por microscopia óptica 72 horas após infecção e interação com os estímulos pelo percentual de macrófagos infectados (A) e número de amastigotas por 100 macrófagos (B). Em (C), 72 horas após infecção o meio RPMI foi substituído por Schneider (meio de cultivo de *Leishmania*) e formas promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante dessas culturas foram contabilizadas 4, 5, 6 e 7 dias após a troca do meio, por contagem em câmara de Neubauer. Em A e B, os valores representam a média ± SD de um experimento representativo de 3 experimentos independentes (n=5 animais por grupo), * p< 0.05 indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste de Dunnes, As barras dos grupos experimentais representam o percentual de aumento em relação ao controle macrófagos infectados com *L. chagasi* (barra branca). (C) Dados são representativos de dois experimentos independentes feito em quintuplicada para cada grupo experimental. Pontos representam médias * p< 0.05, ** p< 0.01.

Infecção por *L. chagasi* em macrófagos deficientes no gene da *Hmox1*

À partir da observação de que a SnPP não interferiu na carga parasitária de macrófagos infectados com promastigotas de *L. chagasi*, e por conta de que essa droga tem efeito sobre a inibição enzimática, mas não de inibir a expressão da HO-1, nós hipotetizamos que o mecanismo de ação da SnPP poderia estar mascarando um efeito de modulação da carga parasitária na ausência de HO-1. Deste modo, decidimos fazer ensaios de avaliação de carga parasitária utilizando macrófagos de camundongos Balb/c e Scid selvagens (HO-1^{+/+}) e deficientes no gene *Hmox1* (HO-1^{-/-}). Para isso, macrófagos derivados de precursores mononucleares de medula óssea de ambas as linhagens foram infectados com formas promastigotas de *L. chagasi* e a carga parasitária foi avaliada 72 horas após infecção pelo método do Schneider. Desde o primeiro dia de contagem de formas promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante dessas culturas, evidenciou-se que os macrófagos de camundongos deficientes no gene *Hmox1* têm a carga parasitária significativamente reduzida quando comparados aos macrófagos de animais selvagens (Fig. 9). Esse fenômeno foi observado tanto em macrófagos derivados de camundongos Scid (Fig. 9A) quanto de camundongos Balb/c (Fig. 9B). Os efeitos da ausência de HO-1 durante a infecção por *L. chagasi* foram mais bem evidenciados pela análise de Área sob a curva (AUC) que considera todos os dias de contagem de liberação de promastigotas no sobrenadante, tanto para macrófagos de camundongos Scid (Fig. 9C) quanto Balb/c (Fig. 9D). Esses resultados demonstram que a HO-1 é de fato requerida para a sobrevivência e replicação intracelular da *L. chagasi*.

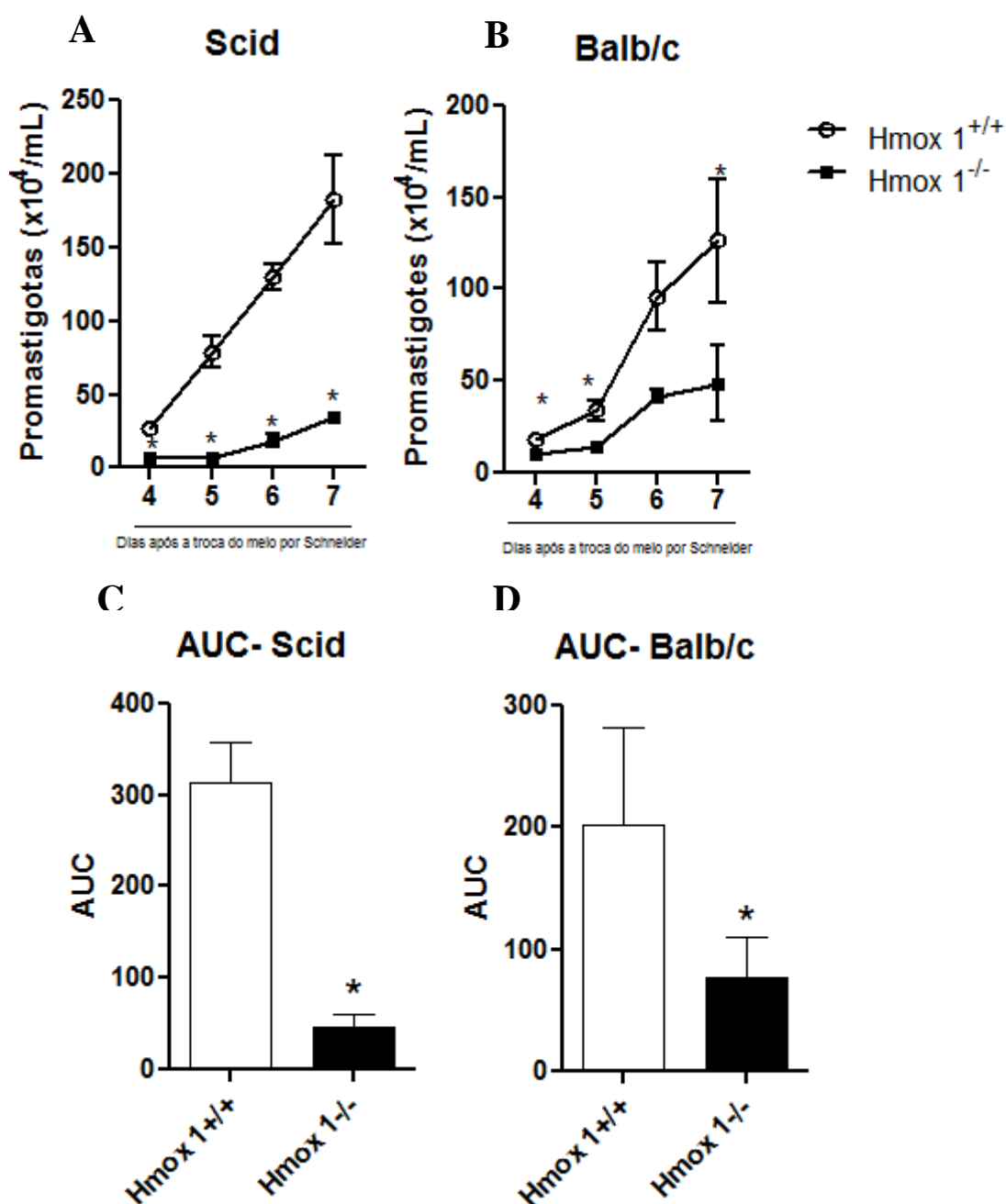


Figura 9. Macrófagos derivados de medula de camundongos Scid e Balb/c deficientes no gene *Hmx1* têm a carga parasitária reduzida quando infectados por *L. chagasi*. Macrófagos foram derivados da medula óssea de duas linhagens de camundongos Scid (A) e Balb/c (B) selvagem (*Hmx1*^{+/+}) e deficientes no gene *Hmx1* (*Hmx1*^{-/-}). 2x10⁵ macrófagos foram plaqueados em placa de 24 poços e infectados com promastigotas de *L. chagasi*, 72 horas após infecção o meio RPMI foi substituído por Schneider (meio de cultivo de *Leishmania*) e formas promastigotas liberadas no sobrenadante dessas culturas foram contabilizadas 4, 5, 6 e 7 dias após a troca do meio, por contagem em câmara de

Neubauer. (C e D) Comparação da área sob a curva (AUC) de infecção de macrófagos de camundongos Scid (C) e camundongos Balb/c (D) selvagem e deficientes na proteína HO-1. Os valores representam a média \pm SD de um experimento representativo de 2 experimentos independentes feitos em quadruplicata. * $p < 0.05$ indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

O tratamento com CoPP reduz a produção de TNF, um importante mecanismo leishmanicida do macrófago.

Com o objetivo de investigar o mecanismo pelo qual a CoPP favorecia a replicação do parasita nós conduzimos ensaios *in vitro* com macrófagos controle ou tratados com concentração sub-ótima de LPS. Inicialmente, resolvemos avaliar a presença de TNF 24 e 48 horas após interação com os estímulos. Dentre os mecanismos leishmanicidas do macrófago, o TNF constitui-se uma relevante resposta da célula hospedeira na resistência à infecção por *Leishmania* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (ENGWERDA et al., 2004; DIAS COSTA et al., 2007).

Observamos que a infecção por *L. chagasi* induziu um aumento significativo na produção de TNF, e que esse efeito foi revertido quando os macrófagos foram tratados com CoPP (Fig. 10A). Da mesma forma, o efeito modulatório da CoPP frente a macrófagos estimulados com LPS, um agonista de TLR4 que é um potente indutor da produção de TNF, nós observamos uma significativa indução de TNF (Fig. 10B). No entanto, quando a infecção por *L. chagasi* em macrófagos tratados com LPS ocorre concomitante à presença de CoPP nós observamos que a indução farmacológica da HO-1 reduz os níveis da produção de TNF (Fig. 10B), evidenciando um importante mecanismo pelo qual a HO-1 subverte mecanismos leishmanicidas da célula hospedeira favorecendo assim a replicação intracelular do parasita.

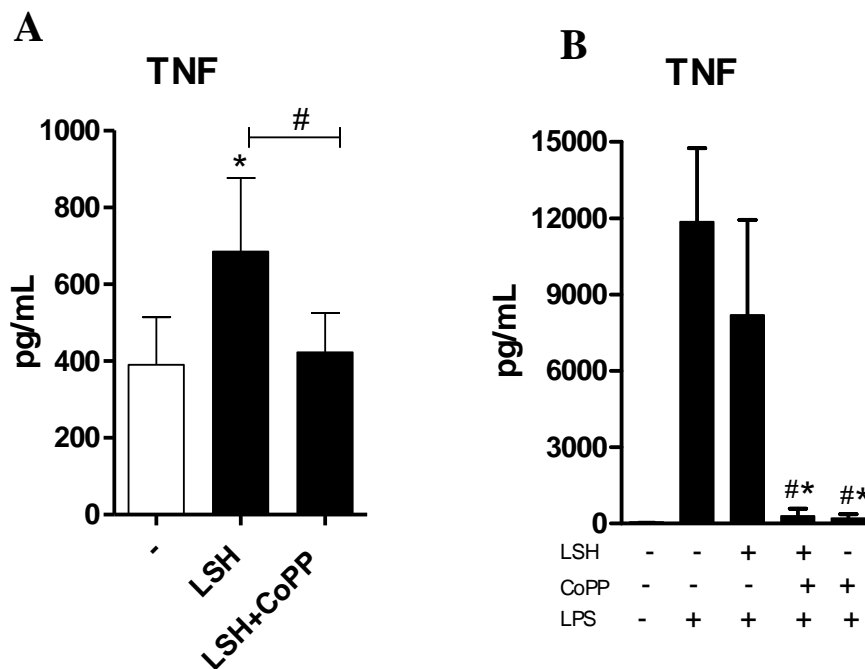


Figura 10. O tratamento com CoPP reduz a produção de TNF em resposta à infecção por *L. chagasi*. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP 50 μ M. A produção de TNF foi avaliada no sobrenadante 24 horas após interação com os estímulos (A). O efeito modulatório do CoPP foi avaliado frente a macrófagos infectados com *L. chagasi* estimulados com 100 ng/mL de LPS por 48hr (B). O tratamento com CoPP reduz a produção de TNF de macrófagos infectados frente à estimulação com LPS. Dados são representativos de um experimento representativo de 3 experimentos independentes feito em quintuplicata. Barras representam média \pm SD. (A) * $p < 0.05$ indica diferença significativa calculada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's . # $p < 0.05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo (LSH+LPS)..

A indução de HO-1 pela CoPP aumenta a razão IL-10/TNF

Estudos prévios demonstram que a indução de HO-1 pela CoPP resulta em redução da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF concomitante com o favorecimento da produção de IL-10 (CHAUVEAU et al., 2005), além disso os efeitos anti-inflamatórios da IL-10 são exercidos via indução da expressão de HO-1 (LEE & CHAU, 2002).

Baseada nas evidências da literatura nós conduzimos ensaios *in vitro* para avaliar se ocorre indução de IL-10, um mediador anti-inflamatório, que estaria favorecendo a replicação da *L. chagasi*. Para isso, infectamos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP50 μ M e LPS 100ng/ml e os sobrenadante dessas culturas foi avaliado para a presença TNF e IL-10 por CBA após 48 horas de cultura.

Observamos que não ocorre diferença das quantidades totais de IL-10 quando os macrófagos foram tratados com CoPP (Fig.11A). No entanto, quando fazemos a razão da produção de IL-10 pela de TNF observamos que no tratamento com CoPP prevalece um ambiente anti-inflamatório (Fig. 11B).

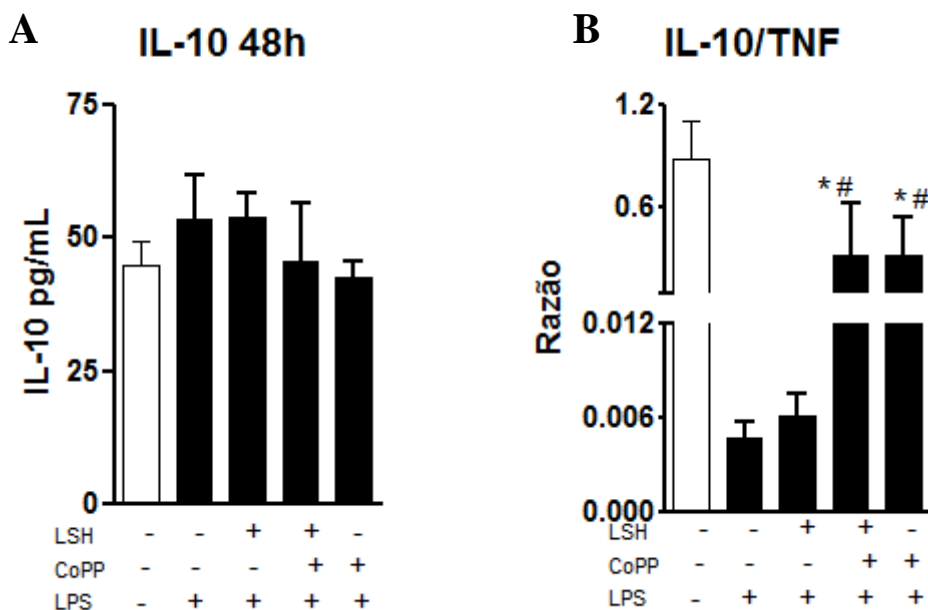


Figura 11- A indução de HO-1 pela CoPP aumenta a presença de IL-10 em relação à de TNF. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP50 μ M e LPS 100ng/mL. A produção de IL-10 e TNF foi avaliada por CBA no sobrenadante dessas culturas 48 horas após interação com os estímulos. (A) Produção de IL-10 após 48 horas de cultura. (B) Razão IL-10/TNF à partir dos valores em pg/mL da produção de TNF e IL-10 no sobrenadante das culturas. Dados são representativos de um experimento representativo de 3 experimentos independentes feito em quintuplicata. Barras representam média \pm SD. * $p < 0.05$ indica diferença significativa quando comparada ao grupo LPS, # $p < 0.05$ indica diferença

significativa quando comparada ao grupo LSH+LPS calculada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's.

O tratamento com CoPP reduz a produção de óxido nítrico (NO) frente a estimulação por LPS

Na infecção de macrófagos murinos por *Leishmania*, o óxido nítrico (NO) é um importante mecanismo efetor no controle da infecção. A inibição da produção de NO leva ao aumento da sobrevivência das formas intracelulares de *Leishmania* e aumento da replicação em macrófagos murinos (GANTT et al., 2001). Nesse contexto nós resolvemos avaliar se a indução da HO-1 pela CoPP poderia estar envolvida no favorecimento da replicação do parasita pela redução de NO. Para isso nós infectamos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP 50 μ M. Os resultados demonstram que a indução da HO-1 pela CoPP é capaz de reverter o efeito do LPS na indução de NO (avaliada indiretamente pelos níveis de nitrito) após 24 (Fig. 12A) e 48 horas (Fig. 12B) de interação com os estímulos.

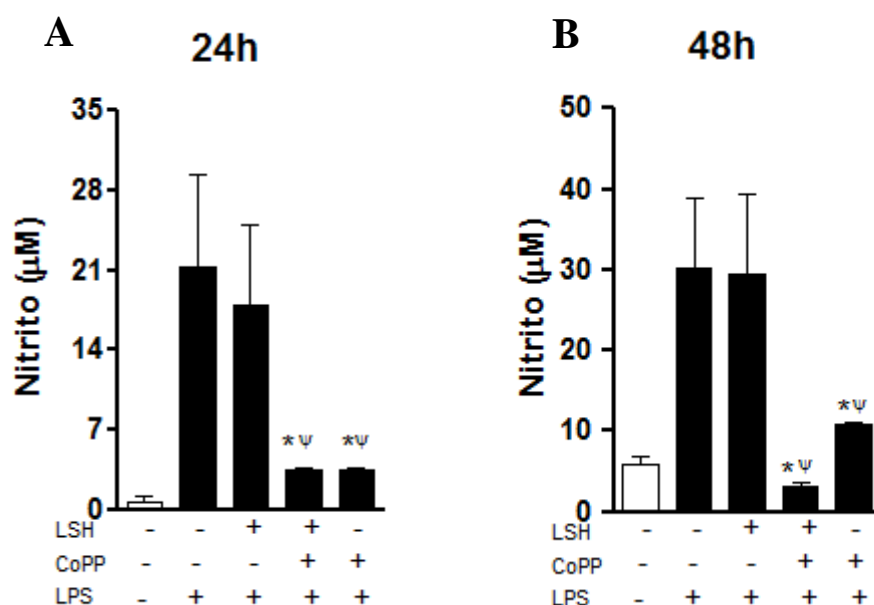


Figura 12- A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de NO induzida frente à estimulação por LPS. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP50µM e LPS 100ng/mL. Os níveis de NO, medidos indiretamente pela produção de nitrito foram avaliados em 24 horas(A) e 48 horas (B) após interação com os estímulos. Dados são representativos de um experimento representativo de dois experimentos independentes feito em quintuplicata. Barras representam média \pm SD. * $p < 0.05$ indica diferença significativa quando comparada ao grupo LPS, Ψ $p < 0.05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo (LSH+LPS) calculada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's.

A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de IL-6 e IL-1 β frente a estimulação por LPS

Na infecção de macrófagos por *Leishmania*, bem como frente à estimulação dessas células por LPS a IL-6 e IL-1 β estão associadas à ativação do macrófago, em modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* (DE LIMA et al., 2007; ETTINGER & WILSON, 2008). Dessa forma, avaliamos a produção de IL-6 e IL1 β no contexto da infecção por *L. chagasi* *in vitro* frente à estimulação por LPS. Para isso, infectamos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP50µM e LPS 100ng/ml e o sobrenadante dessas culturas foi avaliado para a presença

IL-6 e IL1 β . Nós observamos que a indução de HO-1 pela CoPP foi capaz de reverter o efeito do LPS na indução de IL-6 (Fig. 13A) e IL1 β (Fig.13B) após 48 e 24 horas de interação com os estímulos, respectivamente.

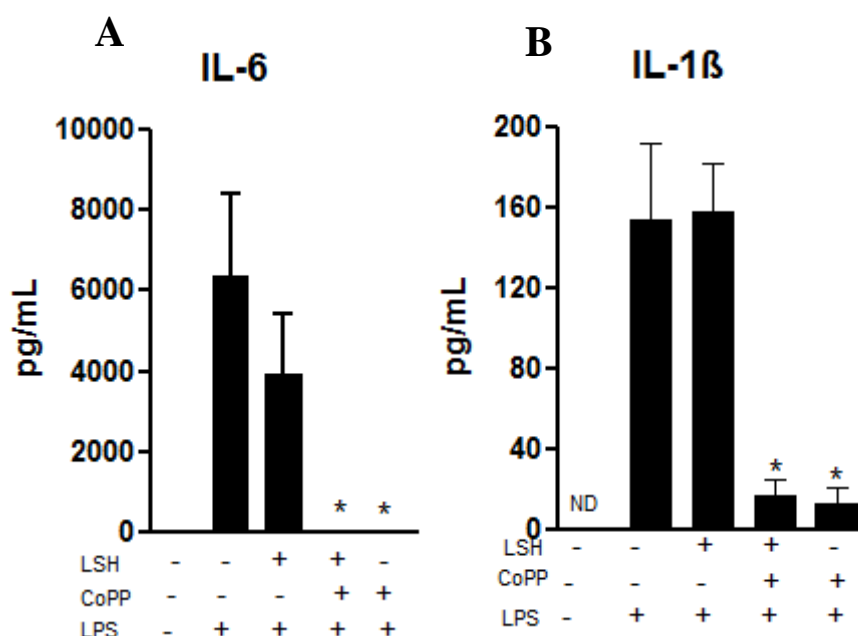


Figura 13- A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de IL-6 e IL1 β induzida frente à estimulação por LPS. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP50 μ M e LPS 100ng/mL. A produção de IL-6 (A) e IL1 β (B) foi avaliada no sobrenadante dessas culturas após 48 hr e 24 hr, respectivamente, de interação com os estímulos. Dados são representativos de um experimento representativo de 2 experimentos independentes feito em quintuplicata. Barras representam média \pm SD. * $p < 0.05$ indica diferença significativa quando comparada ao grupo LSH + LPS calculada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's.

A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção da quimiocina MCP-1 induzida pela estimulação com LPS

Por fim, resolvemos avaliar os efeitos da ativação da HO-1 frente a produção da quimiocina MCP-1 que está associada ao recrutamento e ativação de macrófagos (CONRAD et al., 2007). Desse modo, macrófagos foram cultivados com LPS e infectados com *L. chagasi* na presença de CoPP por 48 e 72 horas. Nós observamos que a indução de HO-1 pela CoPP levou à redução da produção da quimiocina MCP-1 por macrófagos infectados por *L. chagasi* frente a estimulação por LPS. Esse fenômeno ocorreu tanto em 48h (Fig. 14A) quanto em 72 h (Fig. 14B) após interação com os estímulos.

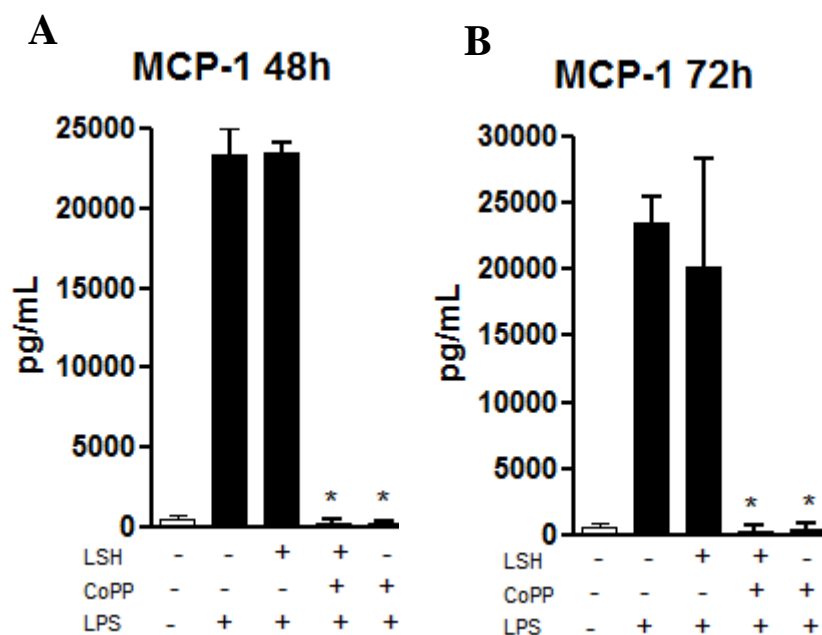


Figura 14- A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de MCP-1 frente à estimulação por LPS. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP50 μ M e LPS 100ng/mL. A produção de MCP-1 foi avaliada por CBA no sobrenadante dessas culturas 48 horas (A) e 72 horas (B) após interação com os estímulos. Dados são representativos de um experimento representativo de 3 experimentos independentes feito em quintuplicata. Barras representam média \pm SD. * $p < 0.05$ indica diferença significativa quando comparada

ao grupo LSH + LPS calculada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's.

A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de PGE₂ induzida pela estimulação por LPS

A indução da HO-1 pela CoPP exerce efeitos na redução de mediadores inflamatórios, assim como o PGE₂ em diferentes modelos experimentais (MEGIAS et al., 2009). Além disso, a produção do mediador PGE₂ representa um importante componente do hospedeiro no contexto da infecção por *Leishmania* (PINHEIRO et al., 2009). Dessa forma resolvemos avaliar a produção de PGE na infecção de macrófagos estimulados por LPS *in vitro* e infectados com *L. chagasi*. Macrófagos foram estimulados com LPS e infectados com *L. chagasi* na presença de CoPP por 24 horas, pudemos observar que a HO-1 reduz a produção de PGE₂, um importante mecanismo redutor da replicação de *Leishmania* em macrófagos de camundongos C57BL/6 (Fig. 15).

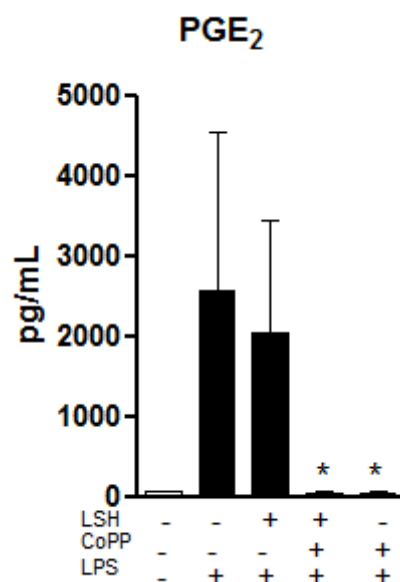


Figura 15- A indução de HO-1 pela CoPP reduz a produção de PGE₂ frente à estimulação por LPS. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP50μM e LPS 100ng/mL. A produção de PGE foi avaliada por ELISA no sobrenadante dessas culturas 24

horas após interação com os estímulos. Dados são representativos de um experimento representativo de 2 experimentos independentes feito em quintuplicata. Barras representam média \pm SD. * $p < 0.05$ indica diferença significativa quando comparada ao grupo LSH + LPS calculada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's.

Interferência na via da HO-1 na avaliação da carga parasitária de *L. chagasi* em macrófagos estimulados com LPS

A partir das observações de que a ativação de HO-1 aumentava a infecção de macrófagos por *L. chagasi*, nosso próximo passo foi avaliar o efeito da estimulação com LPS na carga parasitária em presença de CoPP e SnPP. Para isso, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados com LPS 100 ng/ml foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na presença de CoPP 50 μ M e SnPP 50 μ M. Nós avaliamos a carga parasitária 72 horas após infecção pela contagem das formas promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados. Observamos um aumento do número de parasitas viáveis no grupo tratado com CoPP em macrófagos tratados com LPS (Fig. 16), enquanto que não houve diferença significativa na presença de SnPP. Esse resultado, sugere que a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. chagasi* independente da presença ou não de LPS é aumentada em presença CoPP, concomitante a inibição da resposta anti-inflamatória.

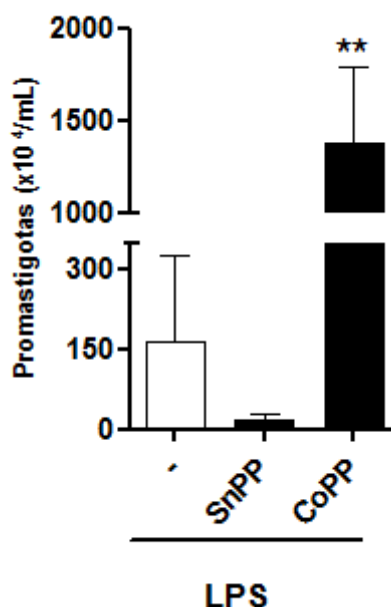


Figura 16. CoPP aumenta a carga parasitária de *L. chagasi* em macrófagos infectados na presença de LPS. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS 100 ng/ml foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* em presença de CoPP 50 μ M ou SnPP 50 μ M. Após 72 horas de infecção, o meio RPMI foi substituído por Schneider (meio de cultivo de *Leishmania*) e formas promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante dessas culturas foram contabilizadas 10 dias após a troca do meio, por contagem em câmara de Neubauer. Dados são representativos de um experimento independente feito em quintuplicada para cada grupo experimental. Pontos representam média \pm SD,** $p < 0.01$ indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste Dunnett's.

DISCUSSÃO

Conhecer a biologia da interação patógeno-célula hospedeira durante a infecção por *Leishmania* é essencial para entender os mecanismos regulatórios imune em resposta ao patógeno. Parasitas do gênero *Leishmania* têm um pronunciado tropismo por macrófagos, embora tenham capacidade de infectar diversos tipos celulares. Amastigotas de *Leishmania* proliferam no fagolisossomo de macrófagos e adquirem nutrientes necessários para seu metabolismo (HUYNH & ANDREWS, 2008). No entanto, esse processo não é passivo, pois a célula hospedeira é capaz de limitar a disponibilidade de nutrientes para o parasito no vacúolo parasitóforo, bem como induzir a produção de moléculas efetoras no controle da infecção (NADERER & MCCONVILLE, 2008). Para a *Leishmania*, desenvolver mecanismos de resistência e subversão da resposta microbicida é crucial para o sucesso da infecção e persistência do parasito no hospedeiro. Nesse contexto, a enzima heme oxigenase 1 (HO-1) foi escolhida como alvo desse estudo para buscar compreender seu papel durante a infecção de macrófagos por *L. chagasi*, principal agente etiológico dos casos da forma visceral da leishmaniose no Brasil.

As manifestações hematológicas são constantes na LV (AL-JURAYYAN et al., 1995). Mecanismos ligados à hemólise, metabolismo do heme e atividade da enzima heme oxigenase podem estar envolvidos no sangramento, especialmente na fase da doença que envolve coagulação e anemia grave (CHAPPUIS et al., 2007). Por se tratar de uma parasitemia visceralizante associada à hemólise e conseqüente liberação de heme, a enzima HO-1 pode ter participação na modulação da carga parasitária bem como na proteção aos efeitos tóxicos do heme. No entanto, ainda não foi explorado o potencial envolvimento da enzima HO-1 no contexto da LV humana, tão pouco existem dados experimentais conclusivos que dêem suporte a entender os mecanismos imunopatogênicos deflagrados por essa enzima que resultem em um desbalanço inflamatório observado nos indivíduos infectados. Aqui nós investigamos o papel da HO-1 na infecção por *L. chagasi* e a modulação das funções pró e anti- inflamatórias de macrófagos.

Nossos dados mostraram que promastigotas de *L. chagasi* são capazes de induzir a liberação de HO-1 no sobrenadante de macrófagos infectados, bem como no lisado dessas

células. O perfil de indução da HO-1 deflagrado pela infecção por promastigotas de *L. chagasi* em macrófagos mostrou-se sustentado após 24 horas de interação com o parasita. Atualmente, as vias de indução de HO-1 durante a infecção não são completamente esclarecidas. Sabe-se que o gene *Hmox 1* é induzido por vários estímulos e envolve múltiplos padrões de sinalização, dentre esses estímulos o gene *Hmox 1* é fortemente induzido por condições de estresse oxidativo (WAGENER et al., 2003). Provavelmente na infecção de macrófagos murinos por *L. chagasi* a indução da HO-1 resulta da situação de estresse oxidativo conhecidamente provocada pelo parasita (GANTT et al., 2001). Entretanto, não podemos descartar que o parasita também induza HO-1 por vias independentes do balanço redox associadas à ativação do gene *Hmox*, como quinases, MAPK, Proteína quinase C (PKC) e fosfatases (ALAM & COOK, 2007).

Pamplona e col., 2007 demonstraram com um modelo experimental de malária cerebral, que na infecção de camundongos Balb/c por *Plasmodium berghei* os níveis da proteína HO-1 são aumentados. Mais recentemente, Epiphanio e cols., 2009 demonstraram que os níveis de mRNA e da proteína HO-1 são aumentados em hepatócitos na infecção *in vivo* com *P. berghei* e em macrófagos peritoneais na infecção por *P. berghei* e *P. yoelli* (EPIPHANIO et al., 2008). Nossas observações reforçam a idéia de que a HO-1 é induzida em diversas doenças parasitárias e está relacionada à proteção ou susceptibilidade do hospedeiro. Além disso, a expressão de HO-1 em infecções como malária, tuberculose e infecções virais têm sido relacionada a um papel protetor do hospedeiro na resposta desencadeada pelas células da imunidade inata e adaptativa à infecção (CHUNG et al., 2009).

Um dos aspectos mais estudados da HO-1 em doenças infecciosas têm sido o seu papel anti-inflamatório e quais as conseqüências para a proliferação do patógeno na célula hospedeira. Apesar do estudo conduzido por Pham e colaboradores, 2005, demonstrar que amastigotas de *L. pifanoi* possuem estratégias para evitar a produção de radicais de oxigênio e que esse mecanismo é dependente da ativação da enzima HO-1, os autores não exploram qual o impacto desses achados no controle da carga parasitária durante a infecção por *Leishmania*. Nesse sentido, nosso trabalho mostra pela primeira vez quais as implicações da ativação da HO-1 na sobrevivência de *L. chagasi* em macrófagos infectados.

Para melhor explorar o papel da HO-1 na infecção de macrófagos por *L. chagasi* nós utilizamos o indutor e inibidor farmacológico da HO-1. A Cobalto protoporfirina (CoPP) é um potente indutor da HO-1 via Bach1 e Nrf2 (fatores nucleares associados à regulação do gene *Hmox1*) (SHAN et al., 2006) enquanto que a Estanho Protoporfirina (SnPP) inibe atividade da enzima HO-1 (YANG et al., 2001).

Observamos que em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 a indução de HO-1 pela CoPP corresponde à um considerável aumento do percentual de macrófagos infectados e quantidade de amastigotas por macrófago. A indução de HO-1 polariza macrófagos derivados de monócitos humanos para um fenótipo anti-inflamatório (WEIS et al., 2009). O aumento do percentual de macrófagos infectados indica que a HO-1 torna os macrófagos susceptíveis à infecção por *L. chagasi*, enquanto que o aumento do número de amastigotas por macrófago é um forte indicador de que a HO-1 é requerida para exercer seu papel anti-inflamatório que auxiliaria na desativação de mecanismos leishmanicidas do macrófago.

De forma similar, o aumento da expressão de HO-1 utilizando um adenovírus em camundongos Balb/C leva ao aumento da replicação de *P. berghei* no fígado quando comparado aos animais controle transfectados apenas com adenovírus não codificante, demonstrando dessa forma que a HO-1 é requerida também para o favorecimento da replicação de *P. berghei in vivo* (EPIPHANIO et al., 2008).

Em nossos experimentos a SnPP (estanho protoporfirina) não reduziu a carga parasitária como esperado. Como a SnPP inibe apenas a atividade da HO-1, essa protoporfirina provoca o acúmulo de substrato (heme) que por sua vez, induz a ligação de proteínas nucleares reguladoras da expressão do gene *Hmox1* (YANG et al., 2001). Esse mesmo efeito foi observado em outro modelo por outro inibidor da HO-1, a zinco protoporfirina (ZnPP) que não influenciou a carga parasitária em camundongos Balb /c infectados com *P. berghei* (PAMPLONA et al., 2007). O efeito das drogas inibidoras SnPP e ZnPP sobre a indução da expressão da HO-1 já foi previamente descrito por Mahin Maines, que foi a primeira autora a descrever a propriedade da ZnPP sobre a HO-1. Utilizando sobrenadante isolado de tecido de rato neonato, Maines demonstrou que a ZnPP inibe a atividade da HO-1 pois compete com o heme na ligação com a enzima (MAINES, 1981; LABBE et al., 1999).

Para descartar o efeito das drogas e esclarecer de forma definitiva o efeito da ausência de HO-1 na infecção *L. chagasi* nós utilizamos macrófagos derivados de precursores mononucleares de medula óssea de camundongos Balb /c e Scid selvagens ou deficientes no gene *Hmox1* (*knockout*). Observamos que os macrófagos de camundongos *knockout* para o gene *Hmox1* têm uma menor carga parasitária quando comparado aos macrófagos selvagens. Esse efeito foi observado em ambas as linhagens de camundongos. Corroborando os nossos achados, Epiphany e cols., 2009 encontraram que na infecção por *P. berghei* e *P. yoelli*, os camundongos *knockout* para o gene *Hmox1* têm menor carga parasitária no sangue e no fígado quando comparado aos camundongos selvagens. Além disso, o tratamento de camundongos Balb /c com o RNA de interferência para o gene da HO-1 induz uma menor carga parasitária em animais infectados. Coletivamente, nossos achados demonstram que a indução de HO-1 é requerida no estabelecimento da infecção por *L. chagasi*.

Já foi demonstrado que a CoPP induz a expressão da HO-1 (SHAN et al., 2000). De forma similar, nossos resultados mostraram que a CoPP foi capaz de induzir aumento na liberação de HO-1 nos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, tanto na infecção por *L. chagasi* quanto apenas no tratamento com CoPP. Como esperado, a CoPP aumenta significativamente a liberação da proteína HO-1 no sobrenadante dessas culturas, enquanto que o SnPP inibiu significativamente esse efeito. Esse resultado nos permite inferir que os efeitos da CoPP sobre carga parasitária na infecção de macrófagos devem-se de fato à proteína HO-1. Já para o tratamento com SnPP, não foi visto uma associação entre o seu efeito em inibir a liberação da HO-1 e a redução da carga parasitária, provavelmente devido aos pontos discutidos acima para essa droga.

À partir das observações de que a infecção por *L. chagasi* induz HO-1 e de que a CoPP induz aumento da replicação do parasita nós hipotetizamos que a HO-1 estaria reduzindo potenciais mecanismos leishmanicidas do macrófagos, dentre eles o TNF.

De fato na LV humana, sintomas como anemia e fraqueza, podem estar associados a níveis aumentados de TNF. Esse mediador foi detectado em pacientes com LV e sua presença tem sido associada à atividade da doença (BARRAL-NETTO et al., 1991). Além disso, o TNF desempenha um importante papel na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares e na regulação de padrões inflamatórios (LOCKSLEY et al., 2001). Nesse

conjunto, as observações de que o tratamento com CoPP reduz a produção de TNF induzida pela *Leishmania*, corroboram o efeito anti-inflamatório da HO-1 e explica um dos mecanismos pelos quais a *Leishmania* se beneficia da indução de HO-1 em macrófagos murinos. Esse achado ainda nos sugere que a indução de HO-1 provocada somente pela infecção é uma estratégia do parasita para desativar mecanismos leishmanicidas do macrófagos.

Uma possível explicação de como a redução da produção de TNF deve favorecer a replicação do parasita é que os mecanismos leishmanicidas do TNF são mediados principalmente por indução de estresse oxidativo (ENGWERDA et al., 2004; MORGAN et al., 2008). A indução de HO-1 corresponde também a ativação de genes associados à proteção do estresse oxidativos (COLLINSON et al., 2010). Logo, a indução de HO-1 parece ser um mecanismo inicial da infecção que permite um ambiente menos hostil para o parasita. Nesse sentido, Pham. e colaboradores, demonstraram que durante a interação de amastigotas e promastigotas de *Leishmania pifanoi* com macrófagos, ambas as formas evolutivas são capazes de induzir HO-1. Segundo esses autores, a enzima HO-1 degrada o heme do complexo NADPH oxidase, impedindo assim a formação viável das subunidades do complexo capaz de gerar superóxido no vacúolo parasitóforo como parte do escape da ativação dos mecanismos leishmanicidas do macrófago (PHAM et al., 2005).

Alguns mediadores pró e anti-inflamatórios são produzidos frente à um primeiro estímulo (*priming*), o LPS é um agonista de TLR4 que polariza e ativa macrófagos para a produção de mediadores pró-inflamatórios (LIEN et al., 2000; LATZ et al., 2002). Para melhor elucidar o efeito da indução de HO-1 pela CoPP nós ativamos as células com LPS e avaliamos alguns mediadores que poderiam estar envolvidos na resposta leishmanicida do macrófagos. Curiosamente, observamos que a indução de HO-1 pela CoPP aumenta a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. chagasi* independente da presença de LPS. Esses achados nos permitem afirmar que embora a infecção por *L. chagasi* tenha efeito na polarização e modulação do macrófago, alguns efeitos na produção de mediadores independem da infecção e parecem ser exercidos primariamente pela HO-1 induzida pela CoPP.

Nós também investigamos se a produção de componentes antiinflamatórios que poderiam estar envolvidos no favorecimento da replicação do parasita. Vários estudos

experimentais murinos têm demonstrado que um dos principais fatores para a progressão da leishmaniose é a IL-10. O bloqueio do receptor IL-10 em camundongos infectados com *L. donovani* reduz drasticamente a infecção (MURRAY et al., 2002), e camundongos IL-10^{-/-} são altamente resistentes à LV (MURPHY et al., 2001). Além disso, a persistência da LV humana também está associada com altos níveis de IL-10 no soro dos pacientes (GHALIB et al., 1993; PERUHYPE-MAGALHAES et al., 2006). Nós achamos que no tratamento com CoPP, prevalece a produção de IL-10 quando comparado aos níveis de TNF, ou seja, a indução de HO-1 deve favorecer a proliferação da *L. chagasi* porque contribui para a prevalência de um ambiente anti-inflamatório.

As respostas associadas a IL-10 são geradas para balancear a excessiva resposta Th1e prevenir a imunopatologia. A alta produção de IL-10 esta associada à redução da resposta inflamatória levando à susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (BELKAID et al., 2001; ANDERSON et al., 2005; STAGER et al., 2010). Os efeitos anti-inflamatórios da IL-10 são exercidos via indução da HO-1 (LEE & CHAU, 2002) e a indução de HO-1 pela IL-10, polariza a diferenciação de macrófagos (SIERRA-FILARDI et al., 2010) e células dendríticas (CHAUVEAU et al., 2005) para um perfil de resposta anti-inflamatória. Dessa forma, podemos especular que na infecção por *L. chagasi* a indução de HO-1 pela CoPP concomitante com a prevalência de IL-10 pode significar a persistência de mais de um estímulo capaz de favorecer a replicação do parasita, induzindo assim uma resposta anti-inflamatória na célula hospedeira.

Em modelos murinos *in vitro* e *in vivo* de infecção por *Leishmania* é bem estabelecido que a ativação de macrófagos por citocinas como IFN γ e TNF leva à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são responsáveis pela atividade leishmanicida (DEY et al., 2005). A produção de NO é o principal mecanismo microbicida em macrófagos murinos (GANTT et al., 2001; DIAS COSTA et al., 2007). Em nosso estudo o tratamento com CoPP foi capaz de reduzir a produção de nitrito à níveis basais ao de uma célula não estimulada com LPS, esse efeito pode ser especificamente atribuído à indução de HO-1, uma vez que as células tratadas com LPS e CoPP apresentaram a mesma redução dos níveis de nitrito, independente da infecção por *L. chagasi*. Esse achado nos permite deduzir que a indução de HO-1 pela CoPP desativa o macrófago frente à estimulação com LPS e que esse mecanismo reduz a produção de um importante mecanismo efetor no controle da infecção por *Leishmania*.

Quanto ao mecanismo de redução das quantidades de nitrito, não podemos descartar o efeito da indução de iNOS pelo monóxido de carbono (CO), um dos produtos da degradação do heme. Já foi descrito que o CO é capaz de aumentar a expressão de iNOS, aumentando os níveis de NO (FORESTI et al., 1997; ZUCKERBRAUN et al., 2003). Essa via de regulação dos níveis de NO indica que em situações específicas de sinalização celular os subprodutos da degradação do heme podem ter efeitos antagônicos. Nessa situação o CO poderia até contribuir para uma atividade leishmanicida do macrófago ao contrário do efeito esperado para a biliverdina e o Fe.

Nossos achados demonstram que além da redução dos níveis de nitrito, a indução de HO-1 pela CoPP reduz também os níveis do mediador IL-1 β frente à estimulação com LPS. Esse resultado é interessante porque a indução de HO-1 inibe a produção de NO por astrócitos humanos ativados com IL-1 β (SHENG et al., 2010). IL-1 é uma citocina pró-inflamatória, considerada como “citocina de alarme” que é secretada por macrófagos. A família da citocina IL-1 inicia e propaga a inflamação por induzir a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e leucócitos (APTE & VORONOV, 2008; STUTZ et al., 2009). IL-1 tem sido relatada como uma citocina que afeta a patogênese da leishmaniose por gerar uma resposta inflamatória e por modular a resposta adaptativa que age para conter a disseminação do parasita (VON STEBUT et al., 2003; KOSTKA et al., 2006). De fato, a redução dos níveis de IL-1 β nas células tratadas com CoPP indicam que a HO-1 reduz um importante mecanismo ativador da atividade leishmanicida do macrófago. Voronov e cols., 2010 demonstraram que animais deficientes no gene da IL-1 β ou no receptor de IL-1 β são mais susceptíveis à infecção por *L. major* do que os camundongos selvagens (VORONOV et al., 2010), corroborando nossa conclusão de que o tratamento com CoPP deve favorecer a proliferação da *L. chagasi* por desativar importantes mecanismos ativadores do macrófago na resposta à infecção, incluindo a produção dessa importante citocina pró-inflamatória.

Os antígenos de *Leishmania* são capazes de induzir a produção de mediadores associados à ativação da célula infectada. Dentre esses mediadores a interleucina-6 (IL-6) destaca-se por estar envolvida na regulação do balanço da resposta Th1-Th2 associada à infecção por *Leishmania* (DE LIMA et al., 2007). Deste modo, resolvemos avaliar a influência do tratamento com CoPP em macrófagos tratados com LPS e infectados com *L. chagasi*. A indução de HO-1 pela CoPP reduziu os níveis de IL-6 frente à estimulação por

LPS. Esse dado nos remete à importância do papel supressor da HO-1 na produção de mediadores inflamatórios, uma vez que a redução dos níveis de IL-6 em pacientes com LV está associado com sucesso no tratamento e, além disso, altos níveis de IL-6 em pacientes com LV é considerado um marcador da forma ativa da doença (PERUHYPE-MAGALHAES et al., 2006). O papel supressor da HO-1 sobre a produção de IL-6 já foi demonstrado em modelo agudo de agressão hepática (KAMIMOTO et al., 2009), assim como em um modelo de inflamação sistêmica em camundongos *knockout* no gene *Hmox1* (KAPTURCZAK et al., 2004). No entanto a relação entre a HO-1 e IL-6 ainda não foi explorado na LV humana.

Quimiocinas são um grupo de proteínas que agem como quimioatrativas para leucócitos e estão envolvidas em muitas atividades biológicas, incluindo ativação de leucócitos para mecanismos anti-microbianos (LUSTER, 1998; DESHMANE et al., 2009). A produção da quimiocina recrutadora de macrófagos (MCP-1) pelos macrófagos também foi estudada em nosso modelo experimental. Vários trabalhos demonstraram a importância dessa quimiocina no contexto da interação parasita-hospedeiro. Macrófagos humanos infectados *in vitro* com *L. infantum* e tratados com MCP-1 têm um aumento significativo na produção de óxido nítrico e mecanismos leishmanicidas do macrófago (BRANDONISIO et al., 2002). Da mesma forma o tratamento com MCP-1 em macrófagos humanos e murinos infectados com *Trypanosoma cruzi* aumenta os níveis de óxido nítrico e a atividade tripanocida da célula hospedeira (ALIBERTI et al., 1999). O tratamento *in vivo* com MCP-1 em camundongos infectados com *L. donovani* reduz a carga parasitária via indução da produção de ânions superóxidos e também reduz a expressão de PKC e ativação de macrófagos, concomitante com o aumento nos níveis de óxido nítrico e TNF (DEY et al., 2005; DEY et al., 2007).

Nossos resultados mostraram que a indução da HO-1 reduz a produção de MCP-1 frente à estimulação por LPS e esse efeito independe da infecção por *L. chagasi*. Epiphonio e cols., 2008 acharam que na ausência de HO-1 em camundongos deficientes no gene *Hmox1* há maior expressão de MCP-1 no fígado de camundongos infectados por *P. berghei* em comparação aos camundongos selvagens. Esse relato juntamente com nossos achados de que indução da HO-1 favorece a replicação da *L. chagasi* e reduz a produção de MCP-1 frente à estimulação por LPS aponta que um dos mecanismos pelos quais a HO-1 favorece

a replicação da *L. chagasi* dá-se pela redução da produção de uma quimiocina com conhecida atividade leishmanicida e ativadora de mecanismos microbicidas do macrófago.

Por fim, nós investigamos a participação da PGE2 no contexto da indução de HO-1. Nós encontramos que a indução da HO-1 pela CoPP reduz a produção de PGE-2 frente à estimulação por LPS. O papel da PGE2 na replicação de *Leishmania* tem sido relatado primariamente como mediador que favorece o crescimento do parasita em macrófagos. A inibição da produção de PGE2 utilizando um inibidor da enzima COX leva à redução da carga parasitária de macrófagos humanos infectados *in vitro* com *L. amazonensis* em co-cultura com neutrófilos apoptóticos (AFONSO et al., 2008).

Ribeiro-Gomes e cols., 2004 demonstraram que macrófagos murinos infectados com *L. major* têm maior carga parasitária quando essas células são tratadas com PGE-2 ou sua produção é induzida por co-cultura de neutrófilos com macrófagos de camundongos Balb /c considerado suscetível para essa espécie do parasita (RIBEIRO-GOMES et al., 2004). No entanto, em macrófagos de camundongos C57BL /6, considerado resistente para infecção de *L. major*, os autores não observaram um papel protetor para a PGE₂. Além disso, o cultivo de macrófagos com PGE2 exógena favorece a replicação de *L. amazonensis* em macrófagos de camundongos Balb/c, mas não de camundongos C57BL /6 (PINHEIRO et al., 2009). Ou seja, é possível que o efeito da PGE2 seja dependente do background do hospedeiro. Nesse contexto, uma vez que em nosso estudo utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6 podemos especular que a inibição da produção de PGE2 em nosso modelo experimental seja um dos mecanismos de ação da HO-1 no favorecimento da replicação intracelular da *L. chagasi*.

Nossos achados são consistentes com dados da literatura em relação à influência da HO-1 sobre os níveis de PGE2. Recentemente foi demonstrado que em células endoteliais cerebrais o LPS induz a expressão de COX-2 e produção de PGE2 via ativação do TLR4, sendo que essa indução é inibida pelo tratamento com CoPP ou com um adenovírus que aumenta a expressão de HO-1 (SHIH & YANG, 2010). Além disso, Feitoza e cols., 2010 demonstraram que o tratamento de camundongos com indometacina, um inibidor da enzima COX, protege os animais do dano tecidual causado em um modelo experimental de reperfusão renal. Nesse contexto, a proteção se dá pela redução da produção de mediadores como PGE2 e TNF e aumento da expressão de IL-10 e HO-1 no rim (FEITOZA et al.,

2010). Ainda corroborando os nossos resultados, o efeito do TNF na indução de COX-2 é inibido quando células vasculares musculares lisas e células endoteliais de veia umbilical humana são tratadas com um agonista do receptor ativado da proliferação de peroxissomos (PPAR- γ), uma via inicial da indução de HO-1. Esse efeito na inibição de COX-2 é abolido quando as células são juntamente tratadas com a SnPP, demonstrando a participação da HO-1 em uma via anti-inflamatória mediada pela ativação de PPAR- γ (KRONKE et al., 2007).

Esses resultados em relação à inibição da produção de PGE2 nos levaram a investigar a produção de TGF- β 1, um importante mediador anti-inflamatório envolvido no favorecimento da replicação da *Leishmania* e desativação de mecanismos leishmanicida do macrófagos (BARRAL-NETTO et al., 1992). O TGF- β 1 acelera a progressão da doença em modelos murinos de leishmaniose, e prolongou a sobrevivência da *L. chagasi* (GANTT et al., 2003) e *T. cruzi* (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000) em cultura de macrófagos. Em nosso modelo experimental fizemos diversas tentativas de dosar TGF- β 1. No entanto, observamos que o tratamento com ambas as protoporfirinas SnPP e CoPP, eliminou a produção de TGF- β 1 à níveis não detectáveis pela técnica utilizada (ELISA). Uma provável explicação para esse fenômeno seja uma limitação experimental por conta do limite de detecção da técnica de detecção de TGF- β 1. Outra possível explicação é que haja um mecanismo central de inibição da produção de TGF- β 1 por protoporfirinas.

Nosso grupo demonstrou recentemente que o heme impede a produção de PGE2 e TGF- β em células mononucleares humana, da mesma forma que pacientes com a forma grave de malária têm maiores níveis de heme e redução dos níveis de PGE2 e TGF- β no plasma (ANDRADE et al., 2010a). Além disso, tem sido proposto que a secreção de TGF- β 1 depende inicialmente da secreção de PGE2 (FADOK et al., 1998; FREIRE-DE-LIMA et al., 2000). Sendo assim, a secreção de TGF- β 1 pode ser impedida quando a síntese de PGE2 é inibida, como acontece no nosso modelo experimental quando os macrófagos são tratados com CoPP, a droga indutora da HO-1.

Não podemos descartar a possibilidade de que os efeitos protetores e anti-inflamatórios da HO-1 estejam de fato sendo desempenhado pelos produtos da degradação do heme, que são o CO, Ferro e Biliverdina. Os mecanismos pelos quais a HO-1 exerce seu efeito protetor são parcialmente descritos e muito se sabe à respeito do efeito cito-protetor

do monóxido de carbono (CO) (MOTTERLINI & OTTERBEIN, 2010). O papel do monóxido de carbono já foi demonstrado em diversos modelos de dano celular. A HO-1 protege células endoteliais da apoptose mediada por TNF e agonistas pró-apoptóticos (SOARES et al., 2002). Da mesma forma, esse efeito ocorre quando as células são tratadas com CO, levando à idéia de que os efeitos protetores da HO-1 são fortemente mediados pela produção de CO (BROUARD et al., 2000).

Ao contrário do átomo de Fe contido no anel de protoporfirina IX de heme, o Fe liberado do heme pode ser neutralizado por uma variedade de mecanismos associados ao metabolismo do ferro, incluindo a Ferritina (FtH), que é induzida pelo próprio Fe e tem um papel cito-protetor (BARANANO et al., 2000; XIE et al., 2005). A expressão de FtH protege células da apoptose mediada por TNF por prevenir o efeito pró-oxidante do Fe livre na ativação constante da c-Jun (quinase), que leva à ativação de caspases efetoras (BERBERAT et al., 2003; MORSE et al., 2003).

O Fe é um co-fator para muitas enzimas e perfis metabólicos e a sua aquisição é fortemente regulada pelas células (WEISS, 2002). Algo ainda interessante em relação ao efeito do Fe é que além do papel cito-protetor, esse componente já foi demonstrado como imprescindível suporte nutricional para tripanossomatídeos como *Trypanosoma* e *Leishmania* (HUYNH & ANDREWS, 2008). *L. chagasi* expressa uma NADPH redutase dependente de Fe, que é capaz de converter o ferro oxidado (Fe^{3+}) em ferro reduzido (Fe^{2+}) que é mais solúvel (WILSON et al., 2002). A adição de holotransferrina é capaz de alcançar o compartimento intracelular dos parasitas e promover o crescimento de *Leishmania* em macrófagos murinos (BORGES et al., 1998). Mais recentemente Andrews e cols., 2006 identificaram o LIT1, um transportador de ferro da membrana plasmática de *L. amazonensis* que é essencial para a replicação intracelular e virulência do parasita em modelos animais (HUYNH et al., 2006). Conjuntamente esses relatos demonstram a importância nutricional do ferro para *Leishmania* e que o parasita tem capacidade de seqüestrar esse nutriente. Essa observação sugere que em nosso modelo experimental um dos mecanismos pelos quais a indução da HO-1 pela CoPP pode aumentar a carga parasitária de macrófagos infectados poderia estar associado ao aumento da disponibilidade de ferro como produto da degradação do heme.

Ainda em relação aos produtos da degradação do heme, a biliverdina que é convertida pela biliverdina redutase a bilirrubina, desempenha também um importante papel cito-protetor. Quando aplicadas em camundongos, tanto a bilirrubina quanto a biliverdina conferem proteção em um modelo de lesão por isquemia e reperfusão, rejeição de transplante e sepse grave (YAMASHITA et al., 2004; GOZZELINO et al., 2010). O efeito do próprio heme sobre a *Leishmania* não pode ser descartado. Existe apenas um artigo indicando a possível existência de uma enzima análoga à HO-1 e algumas enzimas relacionadas à síntese do heme em promastigotas de *L. donovani*. Srivastava e cols., 1997 explanaram sobre a presença de enzimas como δ - aminolevulinato sintase e ferroquelatase em promastigotas de *L. donovani* assim como heme oxigenase e biliverdina redutase (SRIVASTAVA et al., 1997). Embora inovador, esse estudo não é conclusivo porque os autores investigaram apenas a atividade dessas enzimas, não havendo qualquer análise protéica ou genômica dessas proteínas em *Leishmania*. De qualquer forma, o estudo aponta para a capacidade de síntese de heme como suporte nutricional e indica que a *Leishmania* possui estratégias de detoxicação dos efeitos tóxicos do heme.

Portanto, não podemos descartar a participação dos produtos da degradação do heme e do próprio heme no favorecimento da replicação da *L. chagasi* em macrófagos. Pelo contrário, nossos achados indicam que outras protoforfirinas, além da CoPP, ou mecanismos moleculares associados à indução da HO-1 podem favorecer a replicação do parasita. O papel protetor *in vivo* das proteínas ligadoras de heme, como a hemoglobina, hemopexina, haptoglobina e albumina que estão associadas à mecanismos de detoxicação do heme extracelular (KRISTIANSEN et al., 2001; QUAYE, 2008; LARSEN et al., 2010) necessita ser melhor explorado. Em um estudo de comparação de expressão gênica, células mononucleares humanas e células THP-1 (linhagem monocítica humana) foram tratadas com as drogas utilizadas no tratamento contra a leishmaniose, antimônio pentavalente e Glucantime, e infectadas ou não com *L. donovani*. Utilizando ferramenta de *microarray* e PCR *real time*, os autores elucidaram o perfil dos genes alterados pelo tratamento e encontraram que genes associados ao estresse oxidativo como *Hmox1*, Glutathione e Glutamato cisteína ligase são alterados em resposta ao tratamento com as drogas leishmanicidas independente da infecção por *L. donovani* (EL FADILI et al., 2008).

Ainda discutindo a fonte de heme para o parasita, não podemos descartar a importância da HO-1 no contexto da interação da *Leishmania* com células do vetor. Não há descrição de uma enzima capaz de metabolizar o heme para o inseto vetor da *Leishmania*.

Sabe-se, no entanto que o *Rhodnius prolixus*, vetor do *Trypanosoma cruzi*, possui uma estratégia bem descrita de lidar com o heme ingerido após a alimentação. O inseto *R. prolixus* tem uma proteína ligadora de heme na sua hemolinfa, RHBP (Rhodnius Heme-Binding Protein) que impede o dano causado pelo estresse oxidativo provocado pelo heme (DANSA-PETRETSKI et al., 1995). Mais recentemente, Paiva-Silva e cols., 2006 apresentaram uma evidência de que *R. prolixus* expressa a enzima HO capaz de degradar o anel de protoporfirina (heme) (PAIVA-SILVA et al., 2006).

Sabe-se ainda que o heme ou hemoglobina é um fator nutricional importante para o crescimento da *Leishmania*, uma vez que o parasita possui biossíntese incompleta desse composto. Charlab e cols., 1995 demonstraram que a saliva de *Lutzomyia longipalpis* inibe a multiplicação de *L. amazonensis* em culturas *in vitro*, enquanto que a adição de heme às culturas bloqueia a sensibilidade dos parasitas à saliva e induz a diferenciação dos mesmos à fase estacionária, que corresponde à fase de maior infectividade dos parasitas (CHARLAB et al., 1995). Esse achado, juntamente com a consideração de que insetos hematófagos são capazes de metabolizar o heme indicam que a *Leishmania* além de se beneficiar da HO-1 da célula hospedeira poderia também ser favorecida pela HO induzida pelo vetor durante o repasto sanguíneo.

Nossos achados são a primeira evidência de que a infecção por *L. chagasi* é capaz de induzir a secreção da proteína HO-1 e que a indução da mesma, favorece a replicação do parasita por reduzir mecanismos leishmanicidas da célula hospedeira, sugerindo que a HO-1 pode participar de uma forma deletéria na infecção. Uma forte evidência para isso é que em nosso modelo experimental a HO-1 reduziu a produção de todos os mediadores pró-inflamatórios investigados e favoreceu um ambiente com predomínio de IL-10, um importante mediador anti-inflamatório no contexto da LV (STAGER et al., 2010). Dessa forma, esse estudo levanta uma série de novas perspectivas de investigação do papel da HO-1 e proteínas relacionadas à detoxicação do heme no esclarecimento de mecanismos imunopatogênicos associados à patogênese da LV humana e uma possível forma de intervenção terapêutica para forma letal da leishmaniose.

CONCLUSÕES:

1. A infecção por *L. chagasi* é capaz de subverter mecanismos leishmanicidas do macrófago por aumentar os níveis de HO-1 no sobrenadante e no lisado dessas células;
2. A proteína HO-1 do hospedeiro participa na sobrevivência e replicação da *L. chagasi* ratificada pela menor carga parasitária de macrófagos deficientes no gene *Hmox1*;
3. A indução farmacológica da HO-1 pelo CoPP favorece a replicação do parasita caracterizada pela redução nos níveis de um importantes mediadores leishmanicidas, o TNF;
4. Macrófagos tratados com LPS em presença de CoPP induzem um ambiente anti-inflamatório marcado pelo aumento da razão IL-10 em relação às quantidades de TNF;
5. A indução de HO-1 pela CoPP desfavorece o ambiente inflamatório induzido pelo LPS caracterizado pela redução nos níveis de mediadores leishmanicidas e ativadores da resposta microbica do macrófagos, incluindo TNF, IL-6, IL-1 β , MCP-1 e PGE2.

Conclusão Geral:

Com base nos resultados aqui apresentados podemos concluir que a proteína HO-1 participa dos mecanismos de interação da célula hospedeira com o parasita favorecendo a infecção por *L. chagasi* e reduzindo mecanismos leishmanicidas do macrófago.

BIBLIOGRAFIA

AFONSO, L.;BORGES, V. M.;CRUZ, H.;RIBEIRO-GOMES, F. L.;DOSREIS, G. A.;DUTRA, A. N.;CLARENCIO, J.;DE OLIVEIRA, C. I.;BARRAL, A.;BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C. I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J Leukoc Biol**, v.84, n.2, Aug, p.389-96. 2008.

AL-JURAYYAN, N. A.;AL-NASSER, M. N.;AL-FAWAZ, I. M.;AL AYED, I. H.;AL HERBISH, A. S.;AL-MAZROU, A. M.; AL SOHAIBANI, M. O. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **J Trop Pediatr**, v.41, n.3, Jun, p.143-8. 1995.

ALAM, J.; COOK, J. L. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.36, n.2, Feb, p.166-74. 2007.

ALAM, J.;STEWART, D.;TOUCHARD, C.;BOINAPALLY, S.;CHOI, A. M.; COOK, J. L. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. **J Biol Chem**, v.274, n.37, Sep 10, p.26071-8. 1999.

ALIBERTI, J. C.;MACHADO, F. S.;SOUTO, J. T.;CAMPANELLI, A. P.;TEIXEIRA, M. M.;GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v.67, n.9, Sep, p.4819-26. 1999.

ANDERSON, C. F.;MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **J Immunol**, v.174, n.5, Mar 1, p.2934-41. 2005.

ANDRADE, B. B.;ARAÚJO-SANTOS, T.;LUZ, N. F.;KHOURI, R.;BOZZA, M. T.;CAMARGO, L. M.;BARRAL, A.;BORGES, V. M.; BARRAL-NETTO, M. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. **J Immunol**, v.185, n.2, Jul 15, p.1196-204. 2010a.

- ANDRADE, B. B.;DE OLIVEIRA, C. I.;BRODSKYN, C. I.;BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.
Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scand J Immunol**, v.66, n.2-3, Aug-Sep, p.122-7. 2007.
- ANDRADE, B. B.;REIS-FILHO, A.;SOUZA-NETO, S. M.;RAFFAELE-NETTO, I.;CAMARGO, L. M.;BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.4, p.e650. 2010b.
- ANDREWS, N. C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. **Nat Rev Genet**, v.1, n.3, Dec, p.208-17. 2000.
- APTE, R. N.; VORONOV, E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? **Immunol Rev**, v.222, Apr, p.222-41. 2008.
- BACELLAR, O. E. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. . **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, p.24-34. 2005.
- BALLA, J.;BALLA, G.;JENEY, V.;KAKUK, G.;JACOB, H. S.; VERCELLOTTI, G. M. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. **Blood**, v.95, n.11, Jun 1, p.3442-50. 2000.
- BARANANO, D. E.;WOLOSKER, H.;BAE, B. I.;BARROW, R. K.;SNYDER, S. H.; FERRIS, C. D. A mammalian iron ATPase induced by iron. **J Biol Chem**, v.275, n.20, May 19, p.15166-73. 2000.
- BARRAL-NETTO, M.;BADARO, R.;BARRAL, A.;ALMEIDA, R. P.;SANTOS, S. B.;BADARO, F.;PEDRAL-SAMPAIO, D.;CARVALHO, E. M.;FALCOFF, E.; FALCOFF, R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.163, n.4, Apr, p.853-7. 1991.
- 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**, v.257, n.5069, Jul 24, p.545-8. 1992.
- BELKAID, Y.;HOFFMANN, K. F.;MENDEZ, S.;KAMHAWI, S.;UDEY, M. C.;WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the

skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J Exp Med**, v.194, n.10, Nov 19, p.1497-506. 2001.

BERBERAT, P. O.;KATORI, M.;KACZMAREK, E.;ANSELMO, D.;LASSMAN, C.;KE, B.;SHEN, X.;BUSUTTIL, R. W.;YAMASHITA, K.;CSIZMADIA, E.;TYAGI, S.;OTTERBEIN, L. E.;BROUARD, S.;TOBIASCH, E.;BACH, F. H.;KUPIEC-WEGLINSKI, J. W.; SOARES, M. P. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. **Faseb J**, v.17, n.12, Sep, p.1724-6. 2003.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin Infect Dis**, v.24, n.4, Apr, p.684-703. 1997.

BORGES, V. M.;VANNIER-SANTOS, M. A.; DE SOUZA, W. Subverted transferrin trafficking in Leishmania-infected macrophages. **Parasitol Res**, v.84, n.10, Oct, p.811-22. 1998.

BRANDONISIO, O.;PANARO, M. A.;FUMAROLA, I.;SISTO, M.;LEOGRANDE, D.;ACQUAFREDDA, A.;SPINELLI, R.; MITOLO, V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in Leishmania infantum-infected human macrophages. **Clin Exp Med**, v.2, n.3, Nov, p.125-9. 2002.

BROUARD, S.;OTTERBEIN, L. E.;ANRATHER, J.;TOBIASCH, E.;BACH, F. H.;CHOI, A. M.; SOARES, M. P. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. **J Exp Med**, v.192, n.7, Oct 2, p.1015-26. 2000.

CHAPPUIS, F.;SUNDAR, S.;HAILU, A.;GHALIB, H.;RIJAL, S.;PEELING, R. W.;ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.11, Nov, p.873-82. 2007.

CHARLAB, R.;TESH, R. B.;ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. Leishmania amazonensis: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly Lutzomyia longipalpis. **Exp Parasitol**, v.80, n.2, Mar, p.167-75. 1995.

CHAUVEAU, C.;REMY, S.;ROYER, P. J.;HILL, M.;TANGUY-ROYER, S.;HUBERT, F. X.;TESSON, L.;BRION, R.;BERIOU, G.;GREGOIRE, M.;JOSIEN, R.;CUTURI, M. C.;

- ANEGON, I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. **Blood**, v.106, n.5, Sep 1, p.1694-702. 2005.
- CHUNG, S. W.;HALL, S. R.; PERRELLA, M. A. Role of haem oxygenase-1 in microbial host defence. **Cell Microbiol**, v.11, n.2, Feb, p.199-207. 2009.
- CHUNG, S. W.;LIU, X.;MACIAS, A. A.;BARON, R. M.; PERRELLA, M. A. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. **J Clin Invest**, v.118, n.1, Jan, p.239-47. 2008.
- COLLINSON, E. J.;WIMMER-KLEIKAMP, S.;GEREGA, S. K.;YANG, Y. H.;PARISH, C. R.;DAWES, I. W.; STOCKER, R. The yeast homolog of heme oxygenase-1 affords cellular antioxidant protection via the transcriptional regulation of known antioxidant genes. **The Journal of Biological Chemistry**, 12/16/2010. 2010.
- CONRAD, S. M.;STRAUSS-AYALI, D.;FIELD, A. E.;MACK, M.; MOSSER, D. M. Leishmania-derived murine monocyte chemoattractant protein 1 enhances the recruitment of a restrictive population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. **Infect Immun**, v.75, n.2, Feb, p.653-65. 2007.
- COSTA, D. L. FATORES DE PROGNÓSTICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL: Alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. 216 p.
- DA SILVA, J. L.;TIEFENTHALER, M.;PARK, E.;ESCALANTE, B.;SCHWARTZMAN, M. L.;LEVERE, R. D.; ABRAHAM, N. G. Tin-mediated heme oxygenase gene activation and cytochrome P450 arachidonate hydroxylase inhibition in spontaneously hypertensive rats. **Am J Med Sci**, v.307, n.3, Mar, p.173-81. 1994.
- DANSA-PETRETSKI, M.;RIBEIRO, J. M.;ATELLA, G. C.;MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. Antioxidant role of Rhodnius prolixus heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. **J Biol Chem**, v.270, n.18, May 5, p.10893-6. 1995.

- DE LIMA, V. M.; PEIRO, J. R.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R. IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.115, n.1-2, Jan 15, p.189-93. 2007.
- DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v.29, n.6, Jun, p.313-26. 2009.
- DEVADAS, K.; DHAWAN, S. Hemin activation ameliorates HIV-1 infection via heme oxygenase-1 induction. **J Immunol**, v.176, n.7, Apr 1, p.4252-7. 2006.
- DEY, R.; MAJUMDER, N.; BHATTACHARYYA MAJUMDAR, S.; BHATTACHARJEE, S.; BANERJEE, S.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in Leishmania donovani-infected BALB/c mice. **Scand J Immunol**, v.66, n.6, Dec, p.671-83. 2007.
- DEY, R.; SARKAR, A.; MAJUMDER, N.; BHATTACHARYYA MAJUMDAR, S.; ROYCHOUDHURY, K.; BHATTACHARYYA, S.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Regulation of impaired protein kinase C signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.73, n.12, Dec, p.8334-44. 2005.
- DIAS COSTA, J.; DE NAZARETH MEIRELLES, M.; EDUARDO PEREIRA VELLOSO, C.; PORROZZI, R. Leishmania chagasi: cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells. **Exp Parasitol**, v.117, n.4, Dec, p.390-8. 2007.
- DONOVAN, A.; LIMA, C. A.; PINKUS, J. L.; PINKUS, G. S.; ZON, L. I.; ROBINE, S.; ANDREWS, N. C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. **Cell Metab**, v.1, n.3, Mar, p.191-200. 2005.
- EL FADILI, K.; IMBEAULT, M.; MESSIER, N.; ROY, G.; GOURBAL, B.; BERGERON, M.; TREMBLAY, M. J.; LEGARE, D.; OUELLETTE, M. Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-leishmania pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.2, Feb, p.526-33. 2008.

- ENGWERDA, C. R.;ATO, M.;STAGER, S.;ALEXANDER, C. E.;STANLEY, A. C.; KAYE, P. M. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. **Am J Pathol**, v.165, n.6, Dec, p.2123-33. 2004.
- EPIPHANIO, S.;MIKOLAJCZAK, S. A.;GONCALVES, L. A.;PAMPLONA, A.;PORTUGAL, S.;ALBUQUERQUE, S.;GOLDBERG, M.;REBELO, S.;ANDERSON, D. G.;AKINC, A.;VORNLOCHER, H. P.;KAPPE, S. H.;SOARES, M. P.; MOTA, M. M. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. **Cell Host Microbe**, v.3, n.5, May 15, p.331-8. 2008.
- ETTINGER, N. A.; WILSON, M. E. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.6, p.e252. 2008.
- EXNER, M.;MINAR, E.;WAGNER, O.; SCHILLINGER, M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. **Free Radic Biol Med**, v.37, n.8, Oct 15, p.1097-104. 2004.
- FADOK, V. A.;BRATTON, D. L.;KONOWAL, A.;FREED, P. W.;WESTCOTT, J. Y.; HENSON, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest**, v.101, n.4, Feb 15, p.890-8. 1998.
- FEITOZA, C. Q.;SEMEDO, P.;GONCALVES, G. M.;CENEDEZE, M. A.;PINHEIRO, H. S.;DOS SANTOS, O. F.;LANDGRAF, R. G.;PACHECO-SILVA, A.; CAMARA, N. O. Modulation of inflammatory response by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in acute kidney injury. **Inflamm Res**, v.59, n.3, Mar, p.167-75. 2010.
- FERNANDEZ, P. L.;DUTRA, F. F.;ALVES, L.;FIGUEIREDO, R. T.;MOURAO-SA, D.;FORTES, G. B.;BERGSTRAND, S.;LONN, D.;CEVALLOS, R. R.;PEREIRA, R. M.;LOPES, U. G.;TRAVASSOS, L. H.;PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Heme amplifies the innate immune response to microbial molecules through spleen tyrosine kinase (Syk)-dependent reactive oxygen species generation. **J Biol Chem**, v.285, n.43, Oct 22, p.32844-51. 2010.

- FERREIRA, A.;BALLA, J.;JENEY, V.;BALLA, G.; SOARES, M. P. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **J Mol Med**, v.86, n.10, Oct, p.1097-111. 2008.
- FORESTI, R.;CLARK, J. E.;GREEN, C. J.; MOTTERLINI, R. Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells. Involvement of superoxide and peroxynitrite anions. **J Biol Chem**, v.272, n.29, Jul 18, p.18411-7. 1997.
- FREIRE-DE-LIMA, C. G.;NASCIMENTO, D. O.;SOARES, M. B.;BOZZA, P. T.;CASTRO-FARIA-NETO, H. C.;DE MELLO, F. G.;DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v.403, n.6766, Jan 13, p.199-203. 2000.
- GANTT, K. R.;GOLDMAN, T. L.;MCCORMICK, M. L.;MILLER, M. A.;JERONIMO, S. M.;NASCIMENTO, E. T.;BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol**, v.167, n.2, Jul 15, p.893-901. 2001.
- GANTT, K. R.;SCHULTZ-CHERRY, S.;RODRIGUEZ, N.;JERONIMO, S. M.;NASCIMENTO, E. T.;GOLDMAN, T. L.;RECKER, T. J.;MILLER, M. A.; WILSON, M. E. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **J Immunol**, v.170, n.5, Mar 1, p.2613-20. 2003.
- GHALIB, H. W.;PIUVEZAM, M. R.;SKEIKY, Y. A.;SIDDIG, M.;HASHIM, F. A.;EL-HASSAN, A. M.;RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J Clin Invest**, v.92, n.1, Jul, p.324-9. 1993.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.8, n.4, Apr, p.419-33. 2010.
- GOZZELINO, R.;JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.50, p.323-54. 2010.
- GRACA-SOUZA, A. V.;ARRUDA, M. A.;DE FREITAS, M. S.;BARJA-FIDALGO, C.; OLIVEIRA, P. L. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. **Blood**, v.99, n.11, Jun 1, p.4160-5. 2002.

- HENTZE, M. W.;MUCKENTHALER, M. U.;GALY, B.; CAMASCHELLA, C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. **Cell**, v.142, n.1, Jul 9, p.24-38. 2010.
- HIRA, S.;TOMITA, T.;MATSUI, T.;IGARASHI, K.; IKEDA-SAITO, M. Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure. **IUBMB Life**, v.59, n.8-9, Aug-Sep, p.542-51. 2007.
- HIRAI, H.;KUBO, H.;YAMAYA, M.;NAKAYAMA, K.;NUMASAKI, M.;KOBAYASHI, S.;SUZUKI, S.;SHIBAHARA, S.; SASAKI, H. Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. **Blood**, v.102, n.5, Sep 1, p.1619-21. 2003.
- HUYNH, C.; ANDREWS, N. W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of Leishmania. **Cell Microbiol**, v.10, n.2, Feb, p.293-300. 2008.
- HUYNH, C.;SACKS, D. L.; ANDREWS, N. W. A Leishmania amazonensis ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. **J Exp Med**, v.203, n.10, Oct 2, p.2363-75. 2006.
- HVIDBERG, V.;MANIECKI, M. B.;JACOBSEN, C.;HOJRUP, P.;MOLLER, H. J.; MOESTRUP, S. K. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. **Blood**, v.106, n.7, Oct 1, p.2572-9. 2005.
- IMMENSCHUH, S.;HINKE, V.;KATZ, N.; KIETZMANN, T. Transcriptional induction of heme oxygenase-1 gene expression by okadaic acid in primary rat hepatocyte cultures. **Mol Pharmacol**, v.57, n.3, Mar, p.610-8. 2000.
- IMMENSCHUH, S.; RAMADORI, G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. **Biochem Pharmacol**, v.60, n.8, Oct 15, p.1121-8. 2000.
- JENEY, V.;BALLA, J.;YACHIE, A.;VARGA, Z.;VERCELLOTTI, G. M.;EATON, J. W.; BALLA, G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Blood**, v.100, n.3, Aug 1, p.879-87. 2002.

- KAMIMOTO, M.;MIZUNO, S.; NAKAMURA, T. Reciprocal regulation of IL-6 and IL-10 balance by HGF via recruitment of heme oxygenase-1 in macrophages for attenuation of liver injury in a mouse model of endotoxemia. **Int J Mol Med**, v.24, n.2, Aug, p.161-70. 2009.
- KAPTURCZAK, M. H.;WASSERFALL, C.;BRUSKO, T.;CAMPBELL-THOMPSON, M.;ELLIS, T. M.;ATKINSON, M. A.; AGARWAL, A. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. **Am J Pathol**, v.165, n.3, Sep, p.1045-53. 2004.
- KOSTKA, S. L.;KNOP, J.;KONUR, A.;UDEY, M. C.; VON STEBUT, E. Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established Leishmania major infections. **J Invest Dermatol**, v.126, n.7, Jul, p.1582-9. 2006.
- KRISTIANSEN, M.;GRAVERSEN, J. H.;JACOBSEN, C.;SONNE, O.;HOFFMAN, H. J.;LAW, S. K.; MOESTRUP, S. K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v.409, n.6817, Jan 11, p.198-201. 2001.
- KRONKE, G.;KADL, A.;IKONOMU, E.;BLUML, S.;FURNKRANZ, A.;SAREMBOCK, I. J.;BOCHKOV, V. N.;EXNER, M.;BINDER, B. R.; LEITINGER, N. Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.27, n.6, Jun, p.1276-82. 2007.
- KUMAR, A.;DESHANE, J. S.;CROSSMAN, D. K.;BOLISSETTY, S.;YAN, B. S.;KRAMNIK, I.;AGARWAL, A.; STEYN, A. J. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the Mycobacterium tuberculosis dormancy regulon. **J Biol Chem**, v.283, n.26, Jun 27, p.18032-9. 2008.
- LABBE, R. F.;VREMAN, H. J.; STEVENSON, D. K. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. **Clin Chem**, v.45, n.12, Dec, p.2060-72. 1999.
- LARSEN, R.;GOZZELINO, R.;JENEY, V.;TOKAJI, L.;BOZZA, F. A.;JAPIASSU, A. M.;BONAPARTE, D.;CAVALCANTE, M. M.;CHORA, A.;FERREIRA, A.;MARGUTI, I.;CARDOSO, S.;SEPULVEDA, N.;SMITH, A.; SOARES, M. P. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. **Sci Transl Med**, v.2, n.51, Sep 29, p.51ra71. 2010.

- LATZ, E.;VISINTIN, A.;LIEN, E.;FITZGERALD, K. A.;MONKS, B. G.;KURT-JONES, E. A.;GOLENBOCK, D. T.; ESPEVIK, T. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. **J Biol Chem**, v.277, n.49, Dec 6, p.47834-43. 2002.
- LEE, T. S.; CHAU, L. Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. **Nat Med**, v.8, n.3, Mar, p.240-6. 2002.
- LI, X.; DAVID CLARK, J. Chronic morphine exposure and the expression of heme oxygenase type 2. **Brain Res Mol Brain Res**, v.75, n.2, Feb 22, p.179-84. 2000.
- LIEN, E.;MEANS, T. K.;HEINE, H.;YOSHIMURA, A.;KUSUMOTO, S.;FUKASE, K.;FENTON, M. J.;OIKAWA, M.;QURESHI, N.;MONKS, B.;FINBERG, R. W.;INGALLS, R. R.; GOLENBOCK, D. T. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. **J Clin Invest**, v.105, n.4, Feb, p.497-504. 2000.
- LIN, Q.;WEIS, S.;YANG, G.;WENG, Y. H.;HELSTON, R.;RISH, K.;SMITH, A.;BORDNER, J.;POLTE, T.;GAUNITZ, F.; DENNERY, P. A. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. **J Biol Chem**, v.282, n.28, Jul 13, p.20621-33. 2007.
- LIU, N.;WANG, X.;MCCOUBREY, W. K.; MAINES, M. D. Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. **Gene**, v.241, n.1, Jan 4, p.175-83. 2000.
- LOCKSLEY, R. M.;KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v.104, n.4, Feb 23, p.487-501. 2001.
- LUKES, J.;MAURICIO, I. L.;SCHONIAN, G.;DUJARDIN, J. C.;SOTERIADOU, K.;DEDET, J. P.;KUHL, K.;TINTAYA, K. W.;JIRKU, M.;CHOCHOLOVA, E.;HARALAMBOUS, C.;PRATLONG, F.;OBORNIK, M.;HORAK, A.;AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.22, May 29, p.9375-80. 2007.

- LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v.338, n.7, Feb 12, p.436-45. 1998.
- MAINES, M. D. Zinc . protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat. **Biochim Biophys Acta**, v.673, n.3, Mar 18, p.339-50. 1981.
- MAURICIO, I. L.;STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of Leishmania chagasi. **Parasitol Today**, v.16, n.5, May, p.188-9. 2000.
- MEGIAS, J.;GUILLEN, M. I.;CLERIGUES, V.;ROJO, A. I.;CUADRADO, A.;CASTEJON, M. A.;GOMAR, F.; ALCARAZ, M. J. Heme oxygenase-1 induction modulates microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and prostaglandin E(2) production in osteoarthritic chondrocytes. **Biochem Pharmacol**, v.77, n.12, Jun 15, p.1806-13. 2009.
- MILLER, M. A.;MCGOWAN, S. E.;GANTT, K. R.;CHAMPION, M.;NOVICK, S. L.;ANDERSEN, K. A.;BACCHI, C. J.;YARLETT, N.;BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan Leishmania chagasi. **J Biol Chem**, v.275, n.43, Oct 27, p.33883-9. 2000.
- MORGAN, M. J.;KIM, Y. S.; LIU, Z. G. TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. **Cell Res**, v.18, n.3, Mar, p.343-9. 2008.
- MORSE, D.;PISCHKE, S. E.;ZHOU, Z.;DAVIS, R. J.;FLAVELL, R. A.;LOOP, T.;OTTERBEIN, S. L.;OTTERBEIN, L. E.; CHOI, A. M. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. **J Biol Chem**, v.278, n.39, Sep 26, p.36993-8. 2003.
- MOTTERLINI, R.; OTTERBEIN, L. E. The therapeutic potential of carbon monoxide. **Nat Rev Drug Discov**, v.9, n.9, Sep, p.728-43. 2010.
- MUHL, H.;PAULUKAT, J.;HOFLER, S.;HELLMUTH, M.;FRANZEN, R.; PFEILSCHIFTER, J. The HIV protease inhibitor ritonavir synergizes with butyrate for induction of apoptotic cell death and mediates expression of heme oxygenase-1 in DLD-1 colon carcinoma cells. **Br J Pharmacol**, v.143, n.7, Dec, p.890-8. 2004.

- MURPHY, M. L.;WILLE, U.;VILLEGAS, E. N.;HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Eur J Immunol**, v.31, n.10, Oct, p.2848-56. 2001.
- MURRAY, H. W.;LU, C. M.;MAUZE, S.;FREEMAN, S.;MOREIRA, A. L.;KAPLAN, G.; COFFMAN, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect Immun**, v.70, n.11, Nov, p.6284-93. 2002.
- NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol**, v.10, n.2, Feb, p.301-8. 2008.
- ONO, K.;MANNAMI, T.; IWAI, N. Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women. **J Hypertens**, v.21, n.8, Aug, p.1497-503. 2003.
- OTTERBEIN, L. E.;BACH, F. H.;ALAM, J.;SOARES, M.;TAO LU, H.;WYSK, M.;DAVIS, R. J.;FLAVELL, R. A.; CHOI, A. M. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nat Med**, v.6, n.4, Apr, p.422-8. 2000.
- OTTERBEIN, L. E.; CHOI, A. M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.279, n.6, Dec, p.L1029-37. 2000.
- PAIVA-SILVA, G. O.;CRUZ-OLIVEIRA, C.;NAKAYASU, E. S.;MAYA-MONTEIRO, C. M.;DUNKOV, B. C.;MASUDA, H.;ALMEIDA, I. C.; OLIVEIRA, P. L. A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.21, May 23, p.8030-5. 2006.
- PAMPLONA, A.;FERREIRA, A.;BALLA, J.;JENEY, V.;BALLA, G.;EPIPHANIO, S.;CHORA, A.;RODRIGUES, C. D.;GREGOIRE, I. P.;CUNHA-RODRIGUES, M.;PORTUGAL, S.;SOARES, M. P.; MOTA, M. M. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nat Med**, v.13, n.6, Jun, p.703-10. 2007.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v.22, n.1, Jan, p.1-13. 1996.

- PENDRAK, M. L.;YAN, S. S.; ROBERTS, D. D. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Arch Biochem Biophys**, v.426, n.2, Jun 15, p.148-56. 2004.
- PERUHYPE-MAGALHAES, V.;MARTINS-FILHO, O. A.;PRATA, A.;SILVA LDE, A.;RABELLO, A.;TEIXEIRA-CARVALHO, A.;FIGUEIREDO, R. M.;GUIMARAES-CARVALHO, S. F.;FERRARI, T. C.;VAN WEYENBERGH, J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clin Exp Immunol**, v.146, n.1, Oct, p.124-32. 2006.
- PHAM, N. K.;MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infect Immun**, v.73, n.12, Dec, p.8322-33. 2005.
- PINHEIRO, R. O.;NUNES, M. P.;PINHEIRO, C. S.;D'AVILA, H.;BOZZA, P. T.;TAKIYA, C. M.;CORTE-REAL, S.;FREIRE-DE-LIMA, C. G.; DOSREIS, G. A. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes Infect**, v.11, n.2, Feb, p.181-90. 2009.
- PORTO, B. N.;ALVES, L. S.;FERNANDEZ, P. L.;DUTRA, T. P.;FIGUEIREDO, R. T.;GRACA-SOUZA, A. V.; BOZZA, M. T. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. **J Biol Chem**, v.282, n.33, Aug 17, p.24430-6. 2007.
- PROTZER, U.;SEYFRIED, S.;QUASDORFF, M.;SASS, G.;SVORCOVA, M.;WEBB, D.;BOHNE, F.;HOSEL, M.;SCHIRMACHER, P.; TIEGS, G. Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**, v.133, n.4, Oct, p.1156-65. 2007.
- QUAYE, I. K. Haptoglobin, inflammation and disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.102, n.8, Aug, p.735-42. 2008.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.;OTERO, A. C.;GOMES, N. A.;MONIZ-DE-SOUZA, M. C.;CYSNE-FINKELSTEIN, L.;ARNHOLDT, A. C.;CALICH, V. L.;COUTINHO, S. G.;LOPES, M.

- F.; DOSREIS, G. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v.172, n.7, Apr 1, p.4454-62. 2004.
- RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect Agents Dis**, v.4, n.3, Sep, p.143-52. 1995.
- ROTHER, R. P.;BELL, L.;HILLMEN, P.; GLADWIN, M. T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **Jama**, v.293, n.13, Apr 6, p.1653-62. 2005.
- RYTER, S. W.;ALAM, J.; CHOI, A. M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. **Physiol Rev**, v.86, n.2, Apr, p.583-650. 2006.
- RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med**, v.28, n.2, Jan 15, p.289-309. 2000.
- SCHLUESENER, H. J.;KREMSNER, P. G.; MEYERMANN, R. Heme oxygenase-1 in lesions of human cerebral malaria. **Acta Neuropathol**, v.101, n.1, Jan, p.65-8. 2001.
- SCHULTZ, I. J.;CHEN, C.;PAW, B. H.; HAMZA, I. Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis. **J Biol Chem**, v.285, n.35, Aug 27, p.26753-9. 2010.
- SEIXAS, E.;GOZZELINO, R.;CHORA, A.;FERREIRA, A.;SILVA, G.;LARSEN, R.;REBELO, S.;PENIDO, C.;SMITH, N. R.;COUTINHO, A.; SOARES, M. P. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.37, Sep 15, p.15837-42. 2009.
- SHAN, Y.;LAMBRECHT, R. W.;DONOHUE, S. E.; BONKOVSKY, H. L. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. **Faseb J**, v.20, n.14, Dec, p.2651-3. 2006.
- SHAN, Y.;PEPE, J.;LU, T. H.;ELBIRT, K. K.;LAMBRECHT, R. W.; BONKOVSKY, H. L. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. **Arch Biochem Biophys**, v.380, n.2, Aug 15, p.219-27. 2000.

- SHENG, W. S.;HU, S.;NETTLES, A. R.;LOKENS GARD, J. R.;VERCELLOTTI, G. M.; ROCK, R. B. Hemin inhibits NO production by IL-1beta-stimulated human astrocytes through induction of heme oxygenase-1 and reduction of p38 MAPK activation. **J Neuroinflammation**, v.7, p.51. 2010.
- SHIH, R. H.; YANG, C. M. Induction of heme oxygenase-1 attenuates lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse brain endothelial cells. **J Neuroinflammation**, v.7, n.1, Nov 30, p.86. 2010.
- SHILOH, M. U.;MANZANILLO, P.; COX, J. S. Mycobacterium tuberculosis senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection. **Cell Host Microbe**, v.3, n.5, May 15, p.323-30. 2008.
- SIERRA-FILARDI, E.;VEGA, M. A.;SANCHEZ-MATEOS, P.;CORBI, A. L.; PUIG-KROGER, A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. **Immunobiology**, v.215, n.9-10, Sep-Oct, p.788-95. 2010.
- SINHA, S.;MISHRA, S. K.;SHARMA, S.;PATIBANDLA, P. K.;MALLICK, P. K.;SHARMA, S. K.;MOHANTY, S.;PATI, S. S.;MISHRA, S. K.;RAMTEKE, B. K.;BHATT, R.;JOSHI, H.;DASH, A. P.;AHUJA, R. C.;AWASTHI, S.;VENKATESH, V.; HABIB, S. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for Fc gammaRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. **Malar J**, v.7, p.13. 2008.
- SOARES, M. P.; BACH, F. H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. **Trends Mol Med**, v.15, n.2, Feb, p.50-8. 2009.
- SOARES, M. P.;USHEVA, A.;BROUARD, S.;BERBERAT, P. O.;GUNTHER, L.;TOBIASCH, E.; BACH, F. H. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. **Antioxid Redox Signal**, v.4, n.2, Apr, p.321-9. 2002.
- SOARES, R. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An Acad Bras Cienc**, v.75, n.3, Sep, p.301-30. 2003.
- SOE-LIN, S.;APTE, S. S.;ANDRIOPOULOS, B., JR.;ANDREWS, M. C.;SCHRANZHOFER, M.;KAHAWITA, T.;GARCIA-SANTOS, D.; PONKA, P. Nramp1 promotes efficient

- macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.14, Apr 7, p.5960-5. 2009.
- SRIVASTAVA, P.;SHARMA, G. D.;KAMBOJ, K. K.;RASTOGI, A. K.; PANDEY, V. C. Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. **Mol Cell Biochem**, v.171, n.1-2, Jun, p.65-8. 1997.
- STAGER, S.;JOSHI, T.; BANKOTI, R. Immune evasive mechanisms contributing to persistent *Leishmania donovani* infection. **Immunol Res**, v.47, n.1-3, Jul, p.14-24. 2010.
- STUTZ, A.;GOLENBOCK, D. T.; LATZ, E. Inflammasomes: too big to miss. **J Clin Invest**, v.119, n.12, Dec, p.3502-11. 2009.
- SUN, J.;HOSHINO, H.;TAKAKU, K.;NAKAJIMA, O.;MUTO, A.;SUZUKI, H.;TASHIRO, S.;TAKAHASHI, S.;SHIBAHARA, S.;ALAM, J.;TAKETO, M. M.;YAMAMOTO, M.; IGARASHI, K. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. **Embo J**, v.21, n.19, Oct 1, p.5216-24. 2002.
- TENHUNEN, R.;MARVER, H. S.; SCHMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.61, n.2, Oct, p.748-55. 1968.
- TERRY, M. J.;LINLEY, P. J.; KOHCHI, T. Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. **Biochem Soc Trans**, v.30, n.4, Aug, p.604-9. 2002.
- VEEKEN, H.;RITMEIJER, K.;SEAMAN, J.; DAVIDSON, R. A randomized comparison of branded sodium stibogluconate and generic sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis under field conditions in Sudan. **Trop Med Int Health**, v.5, n.5, May, p.312-7. 2000.
- VERCELLOTTI, G. M.;BALLA, G.;BALLA, J.;NATH, K.;EATON, J. W.; JACOB, H. S. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v.22, n.2, p.207-13. 1994.

- VON STEBUT, E.;EHRCHEN, J. M.;BELKAID, Y.;KOSTKA, S. L.;MOLLE, K.;KNOP, J.;SUNDERKOTTER, C.; UDEY, M. C. Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in Leishmania major-susceptible BALB/c mice. **J Exp Med**, v.198, n.2, Jul 21, p.191-9. 2003.
- VORONOV, E.;DOTAN, S.;GAYVORONSKY, L.;WHITE, R. M.;COHEN, I.;KRELIN, Y.;BENCHETRIT, F.;ELKABETS, M.;HUSZAR, M.;EL-ON, J.; APTE, R. N. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. **Int Immunol**, v.22, n.4, Apr, p.245-57. 2010.
- WAGENER, F. A.;EGGERT, A.;BOERMAN, O. C.;OYEN, W. J.;VERHOFSTAD, A.;ABRAHAM, N. G.;ADEMA, G.;VAN KOOYK, Y.;DE WITTE, T.; FIGDOR, C. G. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. **Blood**, v.98, n.6, Sep 15, p.1802-11. 2001.
- WAGENER, F. A.;VOLK, H. D.;WILLIS, D.;ABRAHAM, N. G.;SOARES, M. P.;ADEMA, G. J.; FIGDOR, C. G. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. **Pharmacol Rev**, v.55, n.3, Sep, p.551-71. 2003.
- WEIS, N.;WEIGERT, A.;VON KNETHEN, A.; BRUNE, B. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. **Mol Biol Cell**, v.20, n.5, Mar, p.1280-8. 2009.
- WEISS, G. Iron and immunity: a double-edged sword. **Eur J Clin Invest**, v.32 Suppl 1, Mar, p.70-8. 2002.
- WHO. The World Health Report Geneva, Switzerland. 2008 2002.
- WHO. Health Topics- Tuberculosis 2010 2010.
- WIESEL, P.;PATEL, A. P.;DIFONZO, N.;MARRIA, P. B.;SIM, C. U.;PELLACANI, A.;MAEMURA, K.;LEBLANC, B. W.;MARINO, K.;DOERSCHUK, C. M.;YET, S. F.;LEE, M. E.; PERRELLA, M. A. Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. **Circulation**, v.102, n.24, Dec 12, p.3015-22. 2000.

- WILLIAMS, P. Psychodidae. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, v.10 ed. São Paulo: Atheneu p.311–19. 2000.
- WILSON, M. E.;LEWIS, T. S.;MILLER, M. A.;MCCORMICK, M. L.; BRITIGAN, B. E. Leishmania chagasi: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. **Exp Parasitol**, v.100, n.3, Mar, p.196-207. 2002.
- XIE, C.;ZHANG, N.;ZHOU, H.;LI, J.;LI, Q.;ZARUBIN, T.;LIN, S. C.; HAN, J. Distinct roles of basal steady-state and induced H-ferritin in tumor necrosis factor-induced death in L929 cells. **Mol Cell Biol**, v.25, n.15, Aug, p.6673-81. 2005.
- YACHIE, A.;NIIDA, Y.;WADA, T.;IGARASHI, N.;KANEDA, H.;TOMA, T.;OHTA, K.;KASAHARA, Y.; KOIZUMI, S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. **J Clin Invest**, v.103, n.1, Jan, p.129-35. 1999.
- YAMADA, N.;YAMAYA, M.;OKINAGA, S.;NAKAYAMA, K.;SEKIZAWA, K.;SHIBAHARA, S.; SASAKI, H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. **Am J Hum Genet**, v.66, n.1, Jan, p.187-95. 2000.
- YAMASHITA, K.;MCDAID, J.;OLLINGER, R.;TSUI, T. Y.;BERBERAT, P. O.;USHEVA, A.;CSIZMADIA, E.;SMITH, R. N.;SOARES, M. P.; BACH, F. H. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. **Faseb J**, v.18, n.6, Apr, p.765-7. 2004.
- YANG, G.;NGUYEN, X.;OU, J.;REKULAPELLI, P.;STEVENSON, D. K.; DENNERY, P. A. Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. **Blood**, v.97, n.5, Mar 1, p.1306-13. 2001.
- ZUCKERBRAUN, B. S.;BILLIAR, T. R.;OTTERBEIN, S. L.;KIM, P. K.;LIU, F.;CHOI, A. M.;BACH, F. H.; OTTERBEIN, L. E. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. **J Exp Med**, v.198, n.11, Dec 1, p.1707-16. 2003.