

Bárbara Nery Porto

**MECANISMOS MOLECULARES DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR HEME:
IMPLICAÇÕES EM DESORDENS HEMOLÍTICAS**

Orientador: Dr. Marcelo Torres Bozza



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
Rio de Janeiro
Maio 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Bárbara Nery Porto

**Mecanismos Moleculares da Inflamação Induzida por Heme:
Implicações em Desordens Hemolíticas**



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador: Dr. Marcelo Torres Bozza



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
Rio de Janeiro
Maio 2009

Porto, Bárbara Nery

Mecanismos moleculares da inflamação induzida por heme: implicações em desordens hemolíticas / Bárbara Nery Porto - Rio de Janeiro, 2009

X, 149

Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientador: Marcelo Torres Bozza

Referências Bibliográficas: f. 100

1. Heme 2. Neutrófilo 3. Quimiotaxia 4. Espécies Reativas de Oxigênio 5. Sinalização Intracelular 6. Receptor Quimiotático I. Bozza, Marcelo Torres. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. Mecanismos moleculares da inflamação induzida pr heme: implicações em desordens hemolíticas.

Bárbara Nery Porto

Mecanismos moleculares da inflamação induzida por heme: implicações em desordens hemolíticas

Rio de Janeiro, maio de 2009.

Aprovado por:

Dr. Marcelo Torres Bozza, UFRJ

Dra. Elvira Maria Saraiva, UFRJ

Dra. Maria Augusta Arruda, FIOCRUZ

Dr. Sérgio A. Lira, Mount Sinai School of Medicine, New York

Dr. Cláudio de Azevedo Canetti, UFRJ

Dr. Alexandre Morrot, UFRJ

Dra. Luciana Barros de Arruda Hinds, UFRJ (Revisora)

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Inflamação e Imunidade, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Dr. Marcelo Torres Bozza, que tornou tudo possível. Por ter me aceitado no seu laboratório (duas vezes), por toda a confiança depositada em mim, pela ajuda, pelo exemplo de perseverança, pelo carinho, pelas risadas, pela paciência e, principalmente, por ter me esperado. Marcelino, muito obrigada!!

À Letícia, minha amiga querida, por compartilhar comigo muitas alegrias e frustrações com os experimentos. Por me ajudar sempre. Por me receber na tua casa, de forma tão carinhosa. Lê, obrigada por tudo!!

À Patrícia, amiga querida também, pela ajuda, pela alegria, pelas conversas e risadas e por tornar o laboratório uma “loucura” quando está por perto! Pat, obrigada por tudo!

Aos meus amigos do laboratório, Fabianno, Guilherme, Feijó, Raquel, Jacilene, Fernando, pela ajuda, pelas sugestões, pelas conversas variadas e as risadas e por alegrarem sempre o lab. Gente, vou sentir saudade de vocês!!

À Irania e à Christine, por serem sempre tão queridas e que bom que agora também vão fazer parte desse lab. de “loucos”!

À Dra. Marta Cavalcanti e à Prof. Dra. Cláudia Paiva, que animam o laboratório quando estão por perto.

Ao meu filho muito amado, Luís Felipe, por tornar a minha vida muito mais feliz desde que chegaste e ser a luz no meu caminho.

Ao meu marido amado, Luciano, por estar sempre comigo, mesmo quando estamos longe, por me proporcionar estas vindas, porque sem esse apoio, eu não estaria aqui hoje. Pela tua paciência, pelo teu amor incondicional e carinho. E por me dar e compartilhar comigo a tarefa maravilhosa de sermos pais desse gurizinho figura!

À minha mãe querida, Circe, pelo amor e apoio incondicional! Por toda tua ajuda desde que o Fê nasceu e, em especial, nas nossas vindas para o Rio. Sem ti, nada disso seria possível. Muito obrigada, mãe!!

À minha irmã querida, Marcela, meus sobrinhos amados, Júlia e Pedro Henrique, meu cunhado, Everton, pelo amor e carinho de vocês e pelo apoio e torcida!

Às minhas avós, Alba e Maria da Glória, pelo amor, pelo apoio, pela preocupação e pelos exemplos de vida que vocês me dão. Muito obrigada por tudo!

À Dra. Patrícia Bozza, Lab. de Imunofarmacologia, FIOCRUZ, por atender gentilmente as nossas solicitações.

Ao Dr. Pedro L. Oliveira, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, por gentilmente ceder reagentes quando precisávamos.

À Prof. Dra. Cristina Bonorino, Lab. de Imunologia Celular e Molecular, PUCRS, por ter me recebido de forma tão carinhosa no teu lab.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Dedico esta tese ao meu filho amado, Luís Felipe,
e ao meu marido amado, Luciano. Porque sem vocês, nada disso teria sentido.

Bárbara Nery Porto

Mecanismos moleculares da inflamação induzida por heme: implicações em desordens hemolíticas

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Doenças de hemólise elevada ou dano celular extensivo levam a altos níveis de heme livre e inflamação. O heme induz estresse oxidativo e tem diversas propriedades pró-inflamatórias. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais o heme ativa neutrófilos, causando inflamação, não são completamente entendidos. Considerando que o heme induz a migração de neutrófilos, nós hipotetizamos que o heme tem um efeito quimiotático direto sobre este leucócito através da ativação de uma proteína G inibitória. Nós mostramos que, similar ao heme, diversos análogos foram capazes de induzir a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. As mesoporfirinas, moléculas que não têm os grupamentos vinil em suas estruturas, não foram quimiotáticas para neutrófilos e seletivamente inibiram a migração induzida por heme. Além disso, a migração de neutrófilos induzida por heme foi abolida pelo pré-tratamento com toxina pertussis, um inibidor da proteína G α i, ou com inibidores de PI3K, PLC- β , MAPK e Rho quinase. A indução de espécies reativas de oxigênio pelo heme foi dependente de proteína G α i, PI3K e parcialmente dependente de PLC- β , PKC, MAPK e Rho quinase. A análise de sequência dos receptores BLT1 e BLT2 revelou a presença do motivo ligador de heme (CXXCH) e a migração e a geração de ROS induzidas por heme foram dependentes desses receptores. Por outro lado, a migração de neutrófilos por heme depende da secreção de LTB₄, uma vez que a inibição da enzima 5-LO inibe parcialmente a migração. Juntos, estes resultados indicam que o heme ativa neutrófilos através de vias de sinalização características de moléculas quimioatraentes e sugere que as mesoporfirinas podem ser úteis no tratamento das conseqüências inflamatórias de desordens hemorrágicas e hemolíticas.

Palavras-Chave: Inflamação; Heme; Neutrófilo; Receptor quimiotático; Migração celular; Espécies reativas de oxigênio; Vias de sinalização.

Rio de Janeiro
Maio de 2009

Bárbara Nery Porto

Mecanismos moleculares da inflamação induzida por heme: implicações em desordens hemolíticas

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Hemolysis or extensive cell damage can lead to high concentrations of free heme, causing oxidative stress and inflammation. Considering that heme induces neutrophil chemotaxis, we hypothesize that heme activates a G protein-coupled receptor. Here we show that similar to heme, several heme analogs were able to induce neutrophil migration *in vitro* and *in vivo*. Mesoporphyrins, molecules lacking the vinyl groups in their rings, were not chemotactic to neutrophils and selectively inhibited heme-induced migration. Moreover, migration of neutrophils induced by heme was abolished by pretreatment with pertussis toxin, an inhibitor of G α inhibitory protein, and with inhibitors of phosphoinositide 3-kinase, phospholipase C- β , mitogen-activated protein kinases, or Rho kinase. The induction of reactive oxygen species by heme was dependent of G α inhibitory protein and phosphoinositide 3-kinase, and partially dependent of phospholipase C- β , protein kinase C, mitogen-activated protein kinases, and Rho kinase. BLT1 and BLT2 sequence analysis revealed the presence of the heme binding motif (CXXCH), and heme-induced neutrophil migration and ROS production were dependent on these receptors. On the other hand, heme-induced neutrophil migration is dependent on the generation of LTB₄, since the inhibition of 5-LO partially inhibits the migration. Together, our results indicate that heme activates neutrophils through signaling pathways that are characteristic of chemoattractant molecules and suggest that mesoporphyrins might prove valuable in the treatment of the inflammatory consequences of hemorrhagic and hemolytic disorders.

Key words: Inflammation; Heme; Neutrophil; Chemotactic receptor; Cell migration; Reactive oxygen species; Signaling pathways.

Rio de Janeiro
Maio de 2009

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	2
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. A Resposta Inflamatória	5
1.2. A Resposta Inflamatória durante as Infecções	6
1.3. Espécies Reativas de Oxigênio e Inflamação	9
1.4. Os Fatores Quimiotáticos para Neutrófilos	13
1.5. Vias de Sinalização Ativadas por Receptores Quimiotáticos	17
1.6. A Permeabilidade Vascular e a Inflamação	21
1.7. O Papel do Heme na Inflamação	23
1.8. Desordens Hemolíticas, Heme e Inflamação	32
1.8.1. Malária	32
1.8.2. Anemia Falciforme	33
1.8.3. Injúria de Isquemia-Reperfusão	34
1.9. A Descoberta da Existência de Receptores para Heme	37
2. OBJETIVOS	39
2.1. Objetivo Geral	39
2.2. Objetivos Específicos	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Reagentes	40
3.2. Animais	40
3.3. Soluções-estoque de Heme e seus Análogos	41
3.4. Indução do Recrutamento de Neutrófilos in vivo	41
3.5. Purificação de Neutrófilos Humanos	42
3.6. Ensaio de Quimiotaxia de Neutrófilos	42
3.7. Ensaio de Geração de Espécies Reativas de Oxigênio	43
3.8. Ensaio de Permeabilidade Vascular in vivo	44
3.9. Método para Análise dos Resultados	45

4. RESULTADOS	46
4.1. Moléculas análogas ao heme são quimiotáticas para neutrófilos in vitro.	46
4.2. O efeito do heme é seletivo para neutrófilos.	48
4.3. Moléculas análogas ao heme são quimiotáticas para neutrófilos in vivo.	50
4.4. A mesoporfirina IX inibe a migração de neutrófilos induzida por heme in vitro.	52
4.5. A mesoporfirina IX inibe o recrutamento de neutrófilos induzido por heme ou sangue.	54
4.6. O recrutamento de neutrófilos induzido por heme não depende de TLR-4.	56
4.7. O efeito do heme na migração de neutrófilos depende de vias de sinalização características de quimioatraentes.	58
4.8. A produção de ROS induzida por heme é dependente de proteína Gi e PI3K.	60
4.9. A produção de ROS induzida por heme ocorre pela ativação da NADPH Oxidase.	62
4.10. A migração de neutrófilos induzida por heme depende da geração de ROS pela NADPH oxidase.	64
4.11. O motivo ligador de heme (CXXCH) está presente nos receptores BLT1 e BLT2.	66
4.12. A migração de neutrófilos induzida por heme depende da ativação dos receptores BLT1 e BLT2.	68
4.13. A geração de ROS induzida por heme em neutrófilos é dependente da ativação dos receptores BLT1 e BLT2.	70
4.14. A migração de neutrófilos induzida por heme é parcialmente dependente da produção de LTB ₄ .	72
4.15. O heme induz aumento na permeabilidade vascular in vivo.	74
5. DISCUSSÃO	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
7. ANEXOS	102
7.1. "Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors." <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 2007.	102
7.2. "Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4." <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 2007.	104
7.3. "Biochemical and biological characterization of the venoms of <i>Bothriopsis bilineata</i> and <i>Bothriopsis taeniata</i> (Serpentes: Viperidae)." <i>Toxicon</i> , 2007.	105
7.4. "Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine." <i>Infection and Immunity</i> , 2008.	106

LISTA DE ABREVIATURAS

20-OH-LTB ₄	20-Hidroxi-Leucotrieno B ₄
5-LO	5-Lipoxigenase
ALA-D	δ-Aminolevulinato Dehidratase
ALA-S	δ-Aminolevulinato Sintase
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
BLT	Receptor de Leucotrieno B ₄
BSA	Soroalbumina Bovina
CAP37	<i>Cationic Antimicrobial Protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CGD	Doença Granulomatosa Crônica
CINC	Quimiocina de Neutrófilo induzida por Citocina
CLP	Perfuração e Ligação Cecal
CO	Monóxido de Carbono
Co-PPIX	Cobalto-Protoporfirina IX
COX	Ciclooxigenase
CPO	Coproporfirinogênio III Oxidase
DAG	Diacilglicerol
EC	Célula Endotelial
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FC	Ferroquelatase
fMLP	formil-Metil-Leucil-Fenilalanina
FPR	Receptor de fMLP
GDP	Difosfato de Guanosina
Gi	Proteína G inibitória
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G
GRO-α	<i>Growth Regulated Protein-α</i>
GTP	Trifosfato de Guanosina

Hb	Hemoglobina
HBP	<i>Heparin Binding Protein</i>
HbS	Hemoglobina falciforme
HBSS	Solução Salina de Hanks
HCP	<i>Hamster Cheek Pouch</i>
HETE	Ácido Hidroxieicosatetraenóico
HO	Heme Oxigenase
HOCl	Ácido Hipocloroso
Hp	Haptoglobina
Hpx	Hemopexina
hsp32	<i>Heat Shock Protein 32</i>
HUVEC	Célula Endotelial da Veia Umbilical Humana
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutível
kDa	Quilo Dalton
LFA-1	Antígeno associado à Função de Linfócitos (CD11a/CD18)
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido Lipoteicóico
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
Mac-1	Antígeno de Macrófago (Integrina CD11b/CD18)
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MEL	Eritroleucemia Murina
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófagos
MLCK	Quinase de Cadeia Leve de Miosina
Mn-PPIX	Mangans-Protoporfirina IX
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NF-κB	Fator Nuclear-κB
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas

NO	Óxido Nítrico
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OH [·]	Radical Hidroxila
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógeno
PAR	Receptor Ativado por Protease
PBGD	Porfobilinogênio Deaminase
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PGN	Peptidoglicano
PI3K	Fosfoinositol 3-quinase
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato
PKC	Proteína Quinase C
PLC-β	Fosfolipase C-β
PMA	Forbol Miristato Acetato
PPIX	Protoporfirina IX
PPO	Protoporfirinogênio III Oxidase
PRK	Quinase Relacionada a PKC
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
PSGL-1	Ligante 1 de P-Selectina
PTX	Toxina Pertussis
RhoK	Rho quinase
ROCK	Quinase Associada a Rho
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Sn-PPIX	Estanho-Protoporfirina IX
SOD	Superóxido Dismutase
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-α
URO-D	Uroporfirinogênio III Descarboxilase
URO-S	Uroporfirinogênio III Sintase
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular-1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Zn-PPIX	Zinco-Protoporfirina IX

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Resposta Inflamatória

A resposta imune inata participa de forma decisiva tanto da resposta do hospedeiro a infecções, quanto de processos fisiológicos fundamentais, como o remodelamento tecidual durante o desenvolvimento e após dano tecidual ou na retirada de células senescentes e apoptóticas. Os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos se confundem com os da resposta inflamatória e são objetos de intensas investigações. O desenvolvimento de respostas imunes e inflamatórias envolve a migração de leucócitos do sangue para o tecido-alvo, onde eles exercem suas funções efetoras (Vicente-Manzanares and Sánchez-Madrid 2004). Células imunes, incluindo monócitos, linfócitos e neutrófilos, migram através de mecanismos seqüenciais similares, mas diferem nas suas respostas a sinais quimiotáticos e inflamatórios, particularmente na expressão qualitativa e quantitativa de moléculas de adesão (Wagner and Roth 2000). Na resposta inflamatória aguda, os primeiros leucócitos que se acumulam no sítio de injúria são os neutrófilos (de 4 a 12 horas após o estímulo) e são substituídos por eosinófilos e/ou macrófagos (de 24 a 48 horas), dependendo do tipo de inflamação (Ali, Haribabu et al. 1997).

Os neutrófilos atingem os sítios inflamatórios, como outros leucócitos, migrando através da parede das vênulas de pequeno calibre, cujas células endoteliais expressam moléculas de adesão complementares às que são expressas na superfície destes leucócitos (as principais classes envolvidas são as selectinas e as integrinas). Os estímulos inflamatórios liberados por leucócitos e células endoteliais iniciam o processo de adesão, aumentando a exteriorização de P-selectina, que é armazenada em forma inativa nos corpúsculos de Weibel-Palade dentro das células endoteliais. A interação entre P-selectina na superfície das células endoteliais e Ligante 1 de P-Selectina (PSGL-1) na superfície dos neutrófilos promove o rolamento destas células sobre o endotélio de vasos sangüíneos nos sítios inflamatórios. A

expressão adicional de outras moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, como ICAM-1 e a interação desta com integrinas na superfície dos neutrófilos, Mac-1 e antígeno associado à função de linfócitos (LFA)-1, são necessárias para a adesão firme e a migração transendotelial (Wagner and Roth 2000); (Muller 2003). Além disso, a migração através do endotélio requer um aumento transitório no nível de cálcio intracelular nas células endoteliais. Este aumento de cálcio livre intracelular ativa uma quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), a qual fosforila a miosina II. Isto induz a retração das células endoteliais, permitindo a passagem dos neutrófilos. Dentre os fatores que podem disparar o aumento na concentração intracelular de cálcio nas células endoteliais, estão algumas proteínas catiônicas liberadas por neutrófilos estimulados, tais como a azurocidina (também conhecida como CAP37 - “*Cationic Antimicrobial Protein*” ou HBP - “*Heparin Binding Protein*”) (Pettit and Fay 1998); (Muller 2003); (Edens and Parkos 2003). Uma vez no tecido, os neutrófilos migram em direção ao sítio de injúria por quimiotaxia. Esta migração direcionada dos neutrófilos é governada por sinais extracelulares, como gradientes quimiotáticos (que podem ser solúveis, exibidos na matriz extracelular, ou apresentados na superfície de outras células), (Vicente-Manzanares and Sánchez-Madrid 2004); (van Buul and Hordijk 2004).

1.2. A Resposta Inflamatória durante as Infecções

O disparo da resposta inflamatória é um fator crucial durante um processo infeccioso. A detecção inicial de agentes microbianos depende de receptores especializados, que reconhecem moléculas expressas exclusivamente por microrganismos. Em animais, a detecção de agentes microbianos é mediada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). A estrutura de cada PAMP é altamente conservada e invariante em microrganismos da mesma classe; assim, os animais podem reconhecer a maioria dos microrganismos utilizando um número limitado de PRRs (Inohara and Nuñez 2003). Os receptores Toll (TLR - *Toll-like receptors*) estão

envolvidos no reconhecimento de componentes microbianos, como lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas, flagelina e DNA não-metilado. Além disso, os TLR reconhecem ligantes endógenos induzidos durante a resposta inflamatória (Akira and Takeda 2004). O reconhecimento intracelular de certos patógenos parece envolver uma família de proteínas chamada NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), a qual inclui NOD1 e NOD2 - proteínas que reconhecem o peptidoglicano (PGN) bacteriano no citoplasma (Inohara and Nuñez 2003); (Akira and Takeda 2004).

Os membros da família TLR são expressos diferencialmente entre as células imunes e parecem responder a estímulos diferentes. Além disso, outros tipos celulares, incluindo células endoteliais vasculares, adipócitos, miócitos cardíacos e células epiteliais intestinais também expressam TLRs (Akira and Takeda 2004). A expressão dos TLRs é modulada em resposta a patógenos, citocinas e estresse ambiental (Akira 2006). A localização dos receptores na célula é variável. Os TLR-1, 2, 4, 5 e 6 são expressos na superfície das células, enquanto os TLR-3, 7, 8 e 9 são expressos nas membranas de vesículas endocíticas ou em outros compartimentos intracelulares (Akira 2006).

TLR-2 é o receptor para uma variedade de ligantes microbianos, incluindo lipoproteínas bacterianas, lipopeptídeos, ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanos (PGN) de bactérias gram-positivas, ara-lipoarabinomanana de micobactérias e zimosan de fungos. O reconhecimento bacteriano mediado por TLR-2 participa na eliminação das bactérias, além da sua possível cooperação com TLR-1 e TLR-6. A cooperação de vários TLRs possibilita uma capacidade maior de reconhecimento por essas proteínas, assim como aumenta a sua capacidade de sinalização (Kuijpers and Roos 2004).

TLR-4 é o receptor para a endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS) derivado de bactérias gram-negativas. Isto foi demonstrado em células murinas e humanas. Uma mutação pontual no gene *tlr4* do camundongo C3H/HeJ é responsável pela sua resistência ao LPS (Poltorak, He et al. 1998).

Outro receptor importante no reconhecimento microbiano é o CD14, o qual é uma proteína expressa em altos níveis na superfície de monócitos circulantes. Além disso, o CD14 foi detectado em neutrófilos, estando

localizado dentro dos grânulos. Uma forma solúvel do CD14 está presente no soro. CD14 solúvel e de membrana funciona como co-receptor para ligantes microbianos, como LPS, zimosan, PGN e ara-lipoarabinomanana (Kuijpers and Roos 2004).

Os neutrófilos expressam TLR-2, TLR-4 e CD14 em níveis relativamente baixos (em adição ao TLR-1 e TLR-6) quando comparado a monócitos e macrófagos. Conseqüentemente, a concentração de LPS necessária para ativar neutrófilos é de 100 a 1000 vezes maior do que aquela necessária para ativar macrófagos (Kuijpers and Roos 2004).

Em mamíferos, a ativação de TLRs induz a produção e secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias, através da ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B (Akira and Takeda 2004). Dentre as citocinas pró-inflamatórias secretadas sob ativação dos TLRs, destacam-se o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a interleucina (IL)-1. Estas citocinas estão presentes na maioria das respostas inflamatórias e sua fonte celular principal são macrófagos. A ligação do TNF- α a seu receptor expresso na superfície de neutrófilos induz a ativação e expressão de integrinas, produção de fator ativador de plaquetas (PAF) e outros mediadores e liberação do conteúdo granular. Da mesma maneira, as células endoteliais mobilizam selectinas, aumentam a expressão de ICAM-1 e ativam vias pró-coagulantes em resposta à exposição ao TNF- α . Assim como o TNF- α , a IL-1 induz a expressão de selectinas e ICAM-1 na superfície das células endoteliais e promove a ativação de integrinas na superfície dos neutrófilos (Wagner and Roth 2000). Deste modo, estas citocinas exibem efeitos pró-migratórios sobre os neutrófilos, promovendo eventos necessários para a migração destas células durante a resposta inflamatória.

Durante uma resposta a agentes infecciosos, os neutrófilos também operam junto com anticorpos e fatores do complemento (IgG e C3b, por exemplo), as chamadas opsoninas. Os microrganismos recobertos com essas proteínas são ligados aos neutrófilos através de receptores específicos na membrana (Fc γ Rs, CR1/CR3). A ligação de material opsonizado à superfície do neutrófilo leva à concentração desses receptores em volta da área de contato. Subseqüentemente, o neutrófilo emite pseudópodos, os quais são extensões

da membrana plasmática, que engolfam a partícula e se fundem para formar uma vesícula fechada dentro do neutrófilo, o fagossomo (Kuijpers and Roos 2004). Durante a fagocitose, diversas moléculas sinalizadoras, como proteínas de ligação à actina, proteínas reguladoras do tráfego de membrana, canais iônicos, quinases e lipases são ativadas e contribuem para uma internalização eficiente do patógeno. Além disso, algumas moléculas sinalizadoras que são envolvidas em outras vias de sinalização também participam da fagocitose de agentes microbianos. Fosfoinositol 3-quinase (PI3K), fosfolipase C (PLC), Rho GTPases e proteína quinase C (PKC) constituem pontos de integração para a regulação da fagocitose. Estas moléculas não somente orquestram a mecânica da ingestão de partículas, mas também regulam respostas inflamatórias e o “killing” de microrganismos (Underhill and Ozinsky 2002). Além da fagocitose, a ligação dos receptores fagocíticos também dispara dois outros processos: a geração de espécies reativas de oxigênio e a liberação do conteúdo granular (degranulação) dos neutrófilos (Kuijpers and Roos 2004).

1.3. Espécies Reativas de Oxigênio e Inflamação

Os fagócitos, incluindo os neutrófilos, apresentam diversos mecanismos microbicidas, como peptídeos antimicrobianos (por exemplo, as defensinas) e proteases. Apesar disso, a fagocitose com a geração de espécies reativas de oxigênio e ácido hipocloroso constitui um mecanismo crítico para a maioria dos patógenos (Dale, Boxer et al. 2008). Simultaneamente com a degranulação, um complexo multienzimático ligado à membrana (NADPH oxidase), localizado nas membranas de vesículas secretórias e grânulos específicos dos neutrófilos, é ativado para gerar espécies reativas de oxigênio, necessárias no processo de “killing” (Kuijpers and Roos 2004); (Segal 2005); (Nathan 2006); (Nauseef 2007).

A NADPH oxidase (também conhecida como Nox) é uma NADPH:O₂ oxidoreductase que transfere elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, gerando ânions superóxido (O₂⁻). A unidade catalítica da NADPH oxidase é uma proteína de membrana heterodimérica (flavocitocromo b₅₅₈) que consiste de

duas subunidades: gp91^{phox} e p22^{phox}. Sob estímulo, quatro proteínas citosólicas (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e a GTPase monomérica Rac) são translocadas para a membrana, onde se associam com o flavocitocromo para formar a NADPH oxidase ativa (Fig. 1) (Bogdan 2004); (Segal 2005); (Nauseef 2007). A translocação das proteínas citosólicas envolve eventos específicos de fosforilação (Bokoch and Knaus 2003); (Bogdan 2004).

Como mencionado anteriormente, a NADPH oxidase ativa localiza-se na membrana de vesículas secretórias e também nos grânulos específicos dos neutrófilos, que se fundem tanto com o fagossomo como com a membrana plasmática periférica. Assim, o superóxido pode ser liberado por neutrófilos ativados através de exocitose de grânulos intracelulares que carregam a NADPH oxidase ativa. Desse modo, a liberação de superóxido nos fagossomos é essencial para o “killing” de patógenos, mas o acúmulo de superóxido extracelular pode causar um dano severo aos tecidos do hospedeiro (Bogdan 2004).

O ânion superóxido, produto primário da atividade da NADPH oxidase, pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). As SODs são encontradas no citosol e na membrana interna da mitocôndria. Tanto o superóxido como o peróxido de hidrogênio têm potentes efeitos microbicidas (Bogdan 2004). Além disso, o peróxido de hidrogênio pode reagir com íons cloreto para formar ácido hipocloroso (HOCl), numa reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO). Essa enzima é um constituinte abundante dos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e é liberada sob ativação dentro do fagossomo e no espaço extracelular. O HOCl é tóxico para uma ampla variedade de microrganismos, mas tem vida curta. Entretanto, ele pode reagir com aminas primárias e secundárias e dar origem a N-cloraminas, sendo que algumas são agentes microbicidas muito estáveis (Kuijpers and Roos 2004).

O “burst” oxidativo de neutrófilos (e macrófagos) pode ser disparado pela fagocitose de patógenos, pela internalização de complexos imunes, por quimioatraentes (como IL-8, LTB₄, C5a e PAF), por certos produtos microbianos (como fMLP) e componentes da parede celular fúngica (como zimosan). Além disso, ésteres de forbol, como forbol miristato acetato (PMA)

são ativadores potentes da NADPH oxidase, através da ativação de PKC e subsequente fosforilação de p47^{phox} (Bogdan 2004).

A regulação da atividade da NADPH oxidase requer diversos fatores, inclusive seus próprios componentes. A ativação da serina/treonina quinase AKT por PI3K é requerida para a ativação do “burst” oxidativo em neutrófilos. Além disso, AKT fosforila p47^{phox} em resíduos de serina conhecidos por controlar a atividade oxidase (Chen, Powell et al. 2003). A proteína quinase C (PKC) fosforila gp91^{phox}, aumentando sua atividade catalítica e capacidade de ligação a Rac2, p67^{phox} e p47^{phox}, facilitando a montagem do complexo NADPH oxidase e sua ativação (Raad, Paquet et al. 2009). A ativação da NADPH oxidase e consequente produção de ROS por neutrófilos deficientes de RhoG, GTPase monomérica que atua acima de Rac, é profundamente diminuída em resposta a agonistas de receptores quimiotáticos. Esse defeito é associado com uma redução da ativação de Rac1 e Rac2 (Condliffe, Webb et al. 2006). Por outro lado, Diebold e colaboradores identificaram um antagonismo entre as GTPases monoméricas Rac2 e Cdc42 na regulação da produção de ROS pela NADPH oxidase de neutrófilos. A interação inibitória resulta de uma competição entre o componente oxidase ativo, Rac2, e a oxidase inativa Cdc42 pela ligação ao flavocitocromo b₅₅₈. Esse antagonismo entre membros da família Rho GTPase constitui um novo mecanismo pelo qual a produção de oxidantes pode ser regulada em neutrófilos (Diebold, Fowler et al. 2004). Além disso, parece que Rac2 regula uma ou mais vias de sinalização envolvidas na produção de superóxido que são independentes de p67^{phox} (Carstanjen, Yamauchi et al. 2005).

A importância da NADPH oxidase é claramente demonstrada por defeitos moleculares em qualquer um dos componentes da enzima, o que leva ao desenvolvimento da doença granulomatosa crônica (CGD). A CGD é uma desordem genética na qual os pacientes sofrem infecções bacterianas e fúngicas recorrentes. Neutrófilos deficientes de p40^{phox} mostram produção de ROS diminuída em resposta a estímulos com TNF- α , *S. aureus*, fMLP e zimosan. Além disso, o defeito na produção de ROS pelos neutrófilos em resposta a *S. aureus* correlacionou com um defeito tipo CGD no “killing” desse microrganismo *in vitro* e *in vivo* (Ellson, Davidson et al. 2006).

A maioria dos estudos tem apontado um papel para as ROS geradas pela NADPH oxidase na inflamação. Embora esteja bem documentado que a NADPH oxidase seja a principal fonte de ROS e que parece ser a única enzima cuja função primária é regular a produção de ROS, existem outras fontes de ROS (Ray and Shah 2005). A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial também é uma importante fonte de ROS e uma maior produção de ROS mitocondrial está envolvida na vasculopatia diabética e na injúria de isquemia-reperfusão. Por outro lado, a mitocôndria é sensível ao estresse oxidativo, o que pode resultar em um aumento na produção de ROS mitocondrial (Ray and Shah 2005).

A Xantina oxidase é outra fonte potencial de ROS. É expressa na superfície luminal do endotélio e catalisa a conversão de hipoxantina em ureato, um processo que gera ânions superóxido. Esta enzima é também sensível ao estresse oxidativo (Ray and Shah 2005).

O superóxido gerado pela NADPH oxidase pode influenciar a produção de mais ROS por outras vias enzimáticas. O superóxido gerado pela NADPH oxidase converte a xantina desidrogenase (forma inativa da enzima) em xantina oxidase, podendo resultar num aumento da produção de superóxido. Similarmente, a mitocôndria também sofre ação do superóxido gerado pela NADPH oxidase, aumentando a produção de ROS mitocondrial. Além disso, o superóxido e o peroxinitrito podem degradar H₄B, um cofator essencial para a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Esta enzima é responsável pela geração de NO no endotélio. Para que a eNOS gere NO, é necessário que ela esteja em forma de dímero; sem esse cofator o dímero não é formado e ocorre a geração de superóxido. A geração de ROS neste caso parece estar envolvida na fisiopatologia da vasculopatia diabética, aterosclerose, hipertensão e hipercolesterolemia.

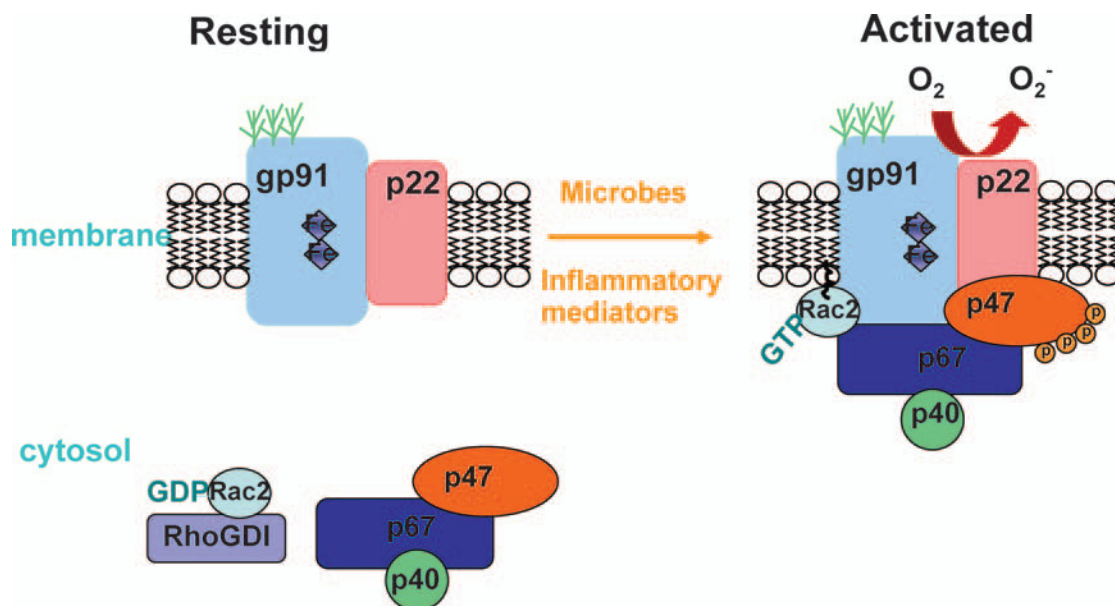


Fig. 1. Ativação da NADPH oxidase. Nos neutrófilos em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão segregados na membrana e no citosol. Na membrana está o flavocitocromo b_{558} , uma hemoproteína heterodimérica composta por $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$. No citosol estão localizados os componentes $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e Rac2, um membro da família Rho de GTPases monoméricas, no seu estado GDP e ligado ao inibidor de dissociação do GDP (RhoGDI). Sob estímulo, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e $p40^{phox}$ são fosforilados, Rac2 troca GDP por GTP e todos são translocados para a membrana. Na membrana, o complexo oxidase transfere elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, gerando ânions superóxido. (Segal 2005).

1.4. Os Fatores Quimiotáticos para Neutrófilos

A migração de leucócitos através do endotélio é dirigida principalmente por uma grande família de citocinas quimiotáticas, as quimiocinas. Além destas, outras moléculas estão envolvidas no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório e incluem peptídeos bacterianos [por exemplo, formil-Met-Leu-Fe (fMLP)], mediadores lipídicos ou componentes do sistema complemento (por exemplo, C5a). Os fatores quimiotáticos para neutrófilos podem ser produzidos por uma ampla variedade de células, incluindo células endoteliais e epiteliais, macrófagos, monócitos, linfócitos, plaquetas, os

próprios neutrófilos e células parenquimais (van Buul and Hordijk 2004); (Vicente-Manzanares and Sánchez-Madrid 2004).

As quimiocinas são moléculas pequenas, estruturalmente relacionadas, com peso molecular que varia de 8 a 14 kDa e são responsáveis pela regulação direta do tráfego de leucócitos no sistema imune (Rollins 1997); (van Buul and Hordijk 2004); (Allen, Crown et al. 2007). A maioria das quimiocinas apresenta quatro resíduos de cisteína N-terminais característicos e, dependendo do arranjo formado pelas duas primeiras cisteínas, elas são classificadas em quatro classes: CXC ou α , porque as duas primeiras cisteínas são separadas por um único aminoácido; CC ou β , onde as duas cisteínas são adjacentes; C ou γ , porque existe apenas uma cisteína no domínio N-terminal e CX₃C ou δ , onde as duas primeiras cisteínas são intercaladas por três aminoácidos (Rollins 1997); (Rossi and Zlotnik 2000) (Zlotnik and Yoshie 2000). Estudos de modelagem sugerem que a estrutura tridimensional das quimiocinas pode acomodar somente 0, 1 ou 3 aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas, o que explica a ausência de uma classe de quimiocinas CX₂C (Rollins 1997).

As quimiocinas CXC são divididas em dois grupos, de acordo com a presença ou ausência do motivo ELR precedendo a primeira cisteína: quimiocinas CXC-ELR ou quimiocinas CXC não-ELR (Rossi and Zlotnik 2000). O grupo das quimiocinas CXC-ELR apresenta uma uniformidade de funções, todas relacionadas com neutrófilos, o que a torna uma família de quimioatraentes e ativadores de neutrófilos. O protótipo das quimiocinas CXC-ELR é IL-8, a qual foi purificada por muitos grupos como um fator derivado de monócitos que atrai neutrófilos, mas não monócitos, em ensaios de quimiotaxia (Rollins 1997).

A IL-8 é um fator quimiotático muito potente para neutrófilos, além de ativar tais células. A expressão do gene e a produção de IL-8 são controladas por diversos mediadores presentes no sítio inflamatório. Enquanto LPS, IL-1 β e TNF- α são capazes de aumentar a produção de IL-8, a IL-10 é um potente inibidor da síntese de IL-8 (Pease and Sabroe 2002). Em adição, o tratamento de neutrófilos com altas doses de fMLP ou LTB₄ na presença de concentrações fisiológicas de fibrinogênio induzem a síntese de IL-8 por essas células. Isto sugere que o fibrinogênio funciona como um efetor durante a evolução da

resposta imune inata, promovendo um maior recrutamento de neutrófilos através da indução da síntese de IL-8 (Kuhns, Nelson et al. 2001).

Os receptores de quimiocina CXCR1 e CXCR2 são expressos principalmente em neutrófilos e ligam a quimiocina IL-8. Enquanto a IL-8 é o agonista primário do CXCR1, outras seis quimiocinas, incluindo GRO- α , CXCL5 e CXCL7 ligam ao CXCR2. Embora os dois receptores ativem a mesmas proteínas G, CXCR1 parece ativar seletivamente a fosfolipase D e o surto respiratório no neutrófilo, enquanto CXCR2 parece ser mais importante na quimiotaxia (Rose, Foley et al. 2004). Além disso, CXCR2 parece utilizar proteínas G distintas para induzir funções diferentes em neutrófilos de ratos. A quimiotaxia promovida por quimiocina de neutrófilo induzida por citocina (CINC)-1 e CINC-3 é sensível à inibição por toxina Pertussis, enquanto que a mobilização de cálcio induzida por CINC-1 e CINC-3 é insensível (Shibata, Konishi et al. 2002).

O Fator Ativador de Plaquetas (PAF) é um mediador lipídico derivado dos fosfolipídios das membranas celulares e é produzido por vários tipos celulares, como células endoteliais, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e macrófagos (Barnes, Chung et al. 1998); (Wagner and Roth 2000). O PAF é capaz de promover processos pró-inflamatórios e pró-adesivos, além de demonstrar um potente efeito quimiotático para neutrófilos (Wagner and Roth 2000). Instilado intratraquealmente em ratos, PAF induz a infiltração de neutrófilos nos pulmões, dano celular e produção de peróxido de hidrogênio (Lee, Hybertson et al. 2002). Além disso, o PAF estimula a fagocitose de partículas de zymosan, com subsequente produção de IL-8, o que aumenta ainda mais a infiltração e ativação de neutrófilos no sítio inflamatório (Au, Teixeira et al. 2001).

As ações intercelulares do PAF são mediadas por receptores acoplados a proteínas G, os quais são expressos na superfície de uma variedade de tipos celulares. O sinal gerado pela ativação do receptor de PAF induz um acúmulo de fosfatidilinositol e aumento no nível de cálcio intracelular. Estas respostas são inibidas por análogos do trifosfato de guanosina (GTP), mas reagem de maneiras distintas à Toxina Pertussis, sugerindo que duas proteínas G

diferentes estão envolvidas na sinalização do receptor de PAF (Prescott, Zimmerman et al. 2000).

O leucotrieno B₄ (LTB₄) é um mediador inflamatório extremamente potente derivado dos fosfolipídios da membrana celular pelas ações seqüenciais de três enzimas: fosfolipase A₂, 5-lipoxigenase e LTA₄ hidrolase. O LTB₄ participa do recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação, direcionando a migração destas células. Foi demonstrado que o LTB₄ é um potente fator quimiotático para neutrófilos humanos *in vivo*: a injeção subcutânea de LTB₄ induz o recrutamento de neutrófilos para a pele. Além de ser quimiotático para neutrófilos, o LTB₄ também é capaz de ativar estas células e prolongar sua sobrevivência, através da inibição da apoptose (Tager and Luster 2003). Foram descritos dois receptores para LTB₄ - BLT1 (Yokomizo, Izumi et al. 1997) e BLT2 (Yokomizo, Kato et al. 2000a). Os receptores BLT1 e BLT2 são ativados por LTB₄ e, numa extensão menor, por 20-hidróxi-LTB₄ (20-OH-LTB₄) e ácido 12-(R)-hidróxieicosatetraenóico (12-(R)-HETE) (Brink, Dahlen et al. 2003); (Tager and Luster 2003). O BLT1 é expresso predominantemente em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. A expressão do BLT1 é induzida em macrófagos ativados, sugerindo uma associação deste receptor em várias desordens inflamatórias. O BLT2 é considerado um receptor de baixa afinidade para o LTB₄ e sua distribuição tecidual é variada (Brink, Dahlen et al. 2003). Os receptores BLT1 e BLT2 possuem a estrutura típica dos receptores quimiotáticos, com sete domínios transmembranares e acoplados à proteína G. A ativação destes receptores por LTB₄ induz quimiotaxia e quimiocinese de neutrófilos e estas respostas são abolidas pelo pré-tratamento das células com toxina Pertussis, sugerindo que proteínas G inibitórias são requeridas para as atividades quimiotáticas e quimiocinéticas dependentes de LTB₄ (Yokomizo, Masuda et al. 2000b).

A anafilatoxina C5a é um potente agonista para células mielóides, especialmente neutrófilos, os quais expressam altos níveis do receptor de C5a (C5aR ou CD88) e apresentam uma resposta quimiotática quando estimulados com esta molécula. C5a induz muitas características da resposta inflamatória aguda, incluindo vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local, contração do músculo liso, edema, aumento da temperatura no tecido e acúmulo de

neutrófilos em sítios extravasculares. Além de ser quimiotático para neutrófilos, C5a tem a capacidade de inibir a apoptose destas células. O receptor de C5a é um membro da família dos receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembranares (Ward 2004).

Dentre os fatores quimiotáticos, os primeiros a terem suas estruturas definidas foram os formil peptídeos. Diferente dos outros quimioatraentes de leucócitos, os formil peptídeos podem se originar de uma fonte endógena, como as proteínas mitocondriais de células rompidas, ou de uma fonte exógena, como as proteínas bacterianas. O receptor de fMLP (FPR) também é membro da família de receptores acoplados à proteína G (Le, Murphy et al. 2002). A interação de fMLP com seu receptor ativa múltiplas vias de transdução de sinal, responsáveis por várias funções dos neutrófilos, como adesão, quimiotaxia, exocitose de grânulos e produção de espécies reativas de oxigênio, que representam a resposta fisiológica à infecção bacteriana e dano tecidual (Dalpiaz, Spisani et al. 2003).

1.5. Vias de Sinalização Ativadas por Receptores Quimiotáticos

As moléculas descritas acima ativam receptores específicos da família de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), os quais direcionam a polimerização de actina e contração, regulam mudanças na morfologia celular e conseqüentemente o tráfego de leucócitos no sistema imune. A família GPCR também ativa outras vias de sinalização, regulando processos como ativação celular, exocitose, mudanças na adesividade da célula e apoptose (Rose, Foley et al. 2004); (Rot and von Andrian 2004); (Vicente-Manzanares and Sánchez-Madrid 2004).

A maioria dos receptores de quimiocina sinaliza predominantemente via membros da classe G inibitória (Gi) de proteínas G sensíveis à toxina Pertussis (PTX) (Fig. 2). A ligação da quimiocina às porções extracelulares de seu receptor modifica a estrutura terciária do receptor, permitindo à parte

intracelular ligar e ativar proteínas G heterotriméricas. Em resposta, as proteínas G ativadas trocam difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (GTP) e se dissociam em subunidades α e $\beta\gamma$. A subunidade α inibe a adenilato ciclase (Katanaev 2001); (Cicchetti, Allen et al. 2002). As subunidades $\beta\gamma$ são essenciais para a quimiotaxia (Neptune and Bourne 1997). As subunidades $\beta\gamma$ medeiam sinais induzidos por quimiocinas e ativam diversas fosfolipases (A_2 , β_2 , β_3 , D) e proteínas quinases (fosfoinositol 3-quinase, proteína quinase C e tirosina quinases). Isto resulta em acúmulo de mediadores lipídicos, como fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato, fluxo de cálcio e ativação de GTPases monoméricas, as quais coordenam os processos de adesão celular, polimerização de actina e eventos contráteis, polarizam a célula e permitem o movimento celular (Wu, Huang et al. 2000); (Katanaev 2001); (Cicchetti, Allen et al. 2002); (Niggli 2003); (Rot and von Andrian 2004); (Ward 2004).

A importância dessas vias de sinalização na quimiotaxia é revelada por estudos utilizando animais geneticamente modificados e ferramentas farmacológicas. Neutrófilos de camundongos deficientes de PI3K γ (PI3K γ -/-) mostram uma redução na resposta quimiotática a IL-8, fMLP e C5a *in vitro*. O impacto *in vivo* desse defeito quimiotático foi demonstrado pela injeção de IL-8 nos camundongos PI3K γ -/-. O recrutamento de neutrófilos induzido pela IL-8 nesses animais foi 60% menor, em comparação com os animais selvagens. Esses dados indicam que PI3K γ é necessária para uma migração eficiente dos neutrófilos em resposta a agentes quimiotáticos (Hirsch, Katanaev et al. 2000). Além disso, o pré-tratamento de neutrófilos com wortmanina ou LY294002, inibidores de PI3K, inibem a migração dessas células e a geração de superóxido induzidas por GM-CSF, PAF e fMLP (Coffer, Geijsen et al. 1998). Estudos farmacológicos com inibidores da PKC mostram que a quimiotaxia de neutrófilos depende da ativação dessa proteína (Niggli 2003).

Em células mamíferas, existem três cascatas de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK): ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinase*), p38 MAPK e c-Jun. As vias de ERK e p38 são ativadas em neutrófilos humanos por quimioatraentes, citocinas pró-inflamatórias, LPS e ligação do receptor Fc γ . Os inibidores de p38 (SB203580) e ERK (PD98059) inibem a quimiotaxia e

a produção de superóxido induzidas por fMLP em neutrófilos. Além disso, a combinação dos dois inibidores tem um efeito aditivo nessa inibição (Coxon, Rane et al. 2003).

Como descrito anteriormente, numerosos mediadores inflamatórios, incluindo IL-8, LTB₄, C5a e fMLP atraem neutrófilos e esses sinais usualmente estão presentes juntos no sítio inflamatório. Pode ser que os neutrófilos tenham que “escolher” quais sinais seguir. Sabe-se que os neutrófilos migram preferencialmente em direção aos quimioatraentes derivados de patógenos, como fMLP, mesmo quando quimioatraentes do hospedeiro estão presentes, como IL-8. Heit e colaboradores sugeriram que esse fenômeno é afetado pela ativação seletiva de vias de sinalização específicas. Parece que os quimioatraentes derivados de patógenos atuam primariamente através da ativação da p38 MAPK. Por outro lado, os quimioatraentes derivados do hospedeiro ativam a via de PI3K/AKT. A ativação de p38 leva a uma inibição de PI3K/AKT, induzindo o neutrófilo a migrar em direção aos quimioatraentes derivados dos patógenos (Heit, Tavener et al. 2002).

As proteínas monoméricas ligadoras de GTP da família Rho podem ser divididas em sete subfamílias: Rho, Rac, Cdc42, Rho D, Rho G, Rho E e TC10 (Niggli 2003). As principais GTPases envolvidas na migração celular são Rho, Rac e Cdc42 (Bishop and Hall 2000). A fosfoinositol 3-quinase (PI3K) ativada pela subunidade $\beta\gamma$ gera fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP₃). PIP₃ ativa a GTPase monomérica Rac, que é indispensável para a polimerização de actina e migração de leucócitos. Entretanto, a sinalização mediada por Rac é suficiente para ativar a maquinaria de actina que propela a célula, mas é insuficiente para suportar a locomoção unidirecional da célula, a “marca registrada” da quimiotaxia. A migração unidirecional requer outra GTPase monomérica, a Cdc42. Sem a ativação da Cdc42, os leucócitos exibem uma migração randômica quando colocados frente a um gradiente quimiotático (Rot and von Andrian 2004). Além disso, estas GTPases estão envolvidas em muitos outros processos celulares que são dependentes do citoesqueleto de actina, como citocinese, fagocitose, pinocitose, morfogênese, entre outros (Bishop and Hall 2000).

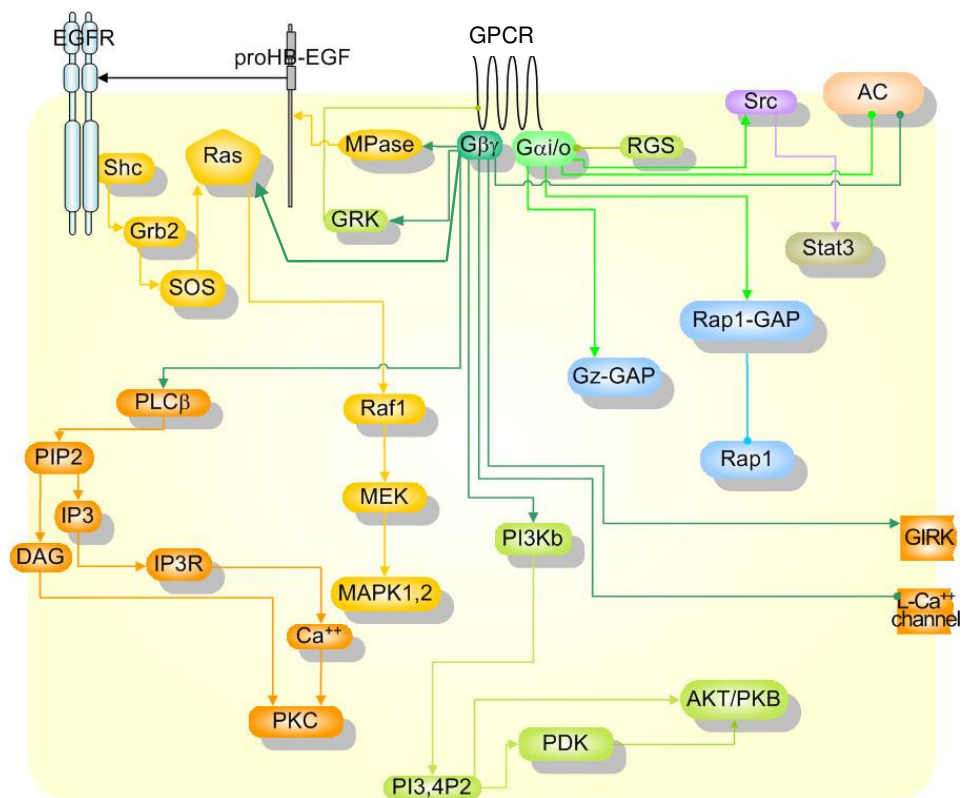


Fig. 2. Vias de sinalização ativadas por receptores quimiotáticos. Adaptado de (Neves, Ram et al. 2002).

1.6. A Permeabilidade Vasculiar e a Inflamação

O sistema vascular é constituído por uma rede de vasos que servem como condutos para o transporte de nutrientes, macromoléculas e células sanguíneas pelo corpo. O leito luminal do vaso sanguíneo consiste de uma única camada de células endoteliais (ECs), que formam a barreira física primária entre o sangue e os tecidos adjacentes. As junções celulares que ligam as Ecs adjacentes são importantes reguladores da permeabilidade do endotélio e são moduladas para permitir a passagem seletiva e específica de células sanguíneas e macromoléculas. A abertura da barreira juncional ocorre durante processos fisiológicos, como a vigilância imune, o reconhecimento de antígenos e durante respostas inflamatórias agudas. Por outro lado, a desregulação das junções celulares pode levar a estados patológicos, incluindo muitas doenças inflamatórias crônicas e edema. Assim, o endotélio e suas junções desempenham um papel crítico na regulação da função vascular durante processos fisiológicos e patológicos. A permeabilidade vascular é a soma de muitos mecanismos que aumentam ou diminuem a função da barreira juncional (Aghajanian, Wittchen et al. 2008).

A regulação das junções das Ecs e, por extensão, da permeabilidade vascular, é mantida por uma variedade de vias de sinalização. Esses sinais funcionam para promover a homeostase, mas também estão envolvidos nas mudanças patológicas da permeabilidade vascular. Essas vias convergem para aumentar a permeabilidade juncional por vários mecanismos (Hu, Place et al. 2008).

Compostos vasoativos, como trombina, histamina e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), podem regular as junções endoteliais por múltiplos mecanismos. Eles podem alterar a arquitetura da “fissura” endotelial, afetando a expressão, localização e estabilidade de proteínas juncionais. Algumas vezes isso ocorre através de fosforilação de proteínas, mas os compostos vasoativos também podem estimular a geração de ROS e ativar as GTPases monoméricas Rho e Rac, levando a mudanças no citoesqueleto (Aghajanian, Wittchen et al. 2008).

As GTPases da família Rho, particularmente RhoA, Rac1 e Cdc42, tem sido implicadas na regulação do citoesqueleto. No contexto das ECs, a sinalização de Rho regula as junções celulares e a permeabilidade vascular, influenciando a dinâmica do citoesqueleto de actina (Aghajanian, Wittchen et al. 2008). Foi demonstrado que a GTPase monomérica RhoA é central para o aumento da permeabilidade das ECs induzido pela trombina. A trombina sinaliza através do receptor ativado por protease (PAR)-1 e de suas proteínas G, G α 12/13 e G α 11/q, para induzir a ativação de RhoA, que ativa a quinase associada a Rho (ROCK) e a quinase relacionada a PKC (PRK), levando à desestabilização da barreira endotelial e aumento na permeabilidade (Gavard and Gutkind 2008).

Numerosos estudos têm mostrado que as ROS podem aumentar a permeabilidade endotelial tanto *in vitro* como *in vivo*, e a permeabilidade aumentada pode ser inibida por antioxidantes e “scavengers” de radicais livres. A geração de ROS também ocorre por ativação de fatores vasoativos, notavelmente o VEGF. Um dos mecanismos pelos quais as ROS podem alterar a permeabilidade vascular envolve a regulação da fosforilação das proteínas juncionais. As ROS inativam as proteínas fosfatases por oxidação de um resíduo de cisteína crítico no sítio catalítico da enzima. As ROS também regulam a permeabilidade juncional, afetando a organização do citoesqueleto de actina (Aghajanian, Wittchen et al. 2008).

A transmigração de leucócitos através das células endoteliais da vasculatura é crítica para a resposta inflamatória. Entretanto, quando a transmigração é excessiva ou inapropriada, ela pode iniciar processos patológicos. Por exemplo, a transmigração de leucócitos é um dos primeiros passos no desenvolvimento de placas ateroscleróticas. A migração transendotelial ocorre em passos sequenciais, conforme mencionado anteriormente, e cada um desses passos inicia uma sinalização que facilita a progressão para o passo seguinte. Além do engajamento de moléculas de adesão nos leucócitos e nas ECs, que levam à transmigração, a ativação de vias de sinalização intracelular também é fundamental para esse processo (Aghajanian, Wittchen et al. 2008).

As células fagocíticas, incluindo os neutrófilos, geram altas concentrações de ROS, que aumentam a ligação dessas células às ECs devido à expressão aumentada de moléculas de adesão na superfície das ECs. Além disso, as ROS produzidas por neutrófilos estimulados com fMLP aumentam a permeabilidade vascular (Zhu and He 2006). O LTB₄ induz a transmigração de células HL-60 diferenciadas em neutrófilos com DMSO e de neutrófilos humanos através das células epiteliais pulmonares A549. Esse efeito foi mediado pelos receptores BLT e foi inibido pelo tratamento das células com o antioxidante N-Acetilcisteína, com um inibidor de NADPH oxidase (DPI) ou com um inibidor de ERK (PD98059). Esses dados sugerem que a migração transepitelial de neutrófilos é mediada pela geração de ROS, que leva à ativação de ERK. A relevância fisiológica desse mecanismo foi demonstrada pela instilação intratraqueal de LTB₄ em camundongos, a qual causou o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas através do epitélio pulmonar. Essa resposta ao LTB₄ foi bloqueada pelo NAC, DPI, PD98050 e pelo antagonista de BLT1 (Woo, Yoo et al. 2003).

1.7. O Papel do Heme na Inflamação

O heme (Ferro Protoporfirina IX) é um complexo não-protéico constituído de um átomo de ferro ligado a um anel tetrapirrólico (Fig. 3). Sua síntese ocorre em todas as células humanas nucleadas a partir de glicina e succinil-CoA, e envolve uma série de reações enzimáticas que tomam lugar parcialmente dentro da mitocôndria e parcialmente no citoplasma (Fig. 4) (Wagener, Volk et al. 2003). Devido à importância da biossíntese de heme nos processos biológicos, um defeito parcial em uma das enzimas usadas na síntese desta molécula é associado com diversos estados patológicos. Exemplos dessas desordens herdadas ou adquiridas são porfirias, síndrome mielodisplásica e anemia sideroblástica (Wagener, Volk et al. 2003).

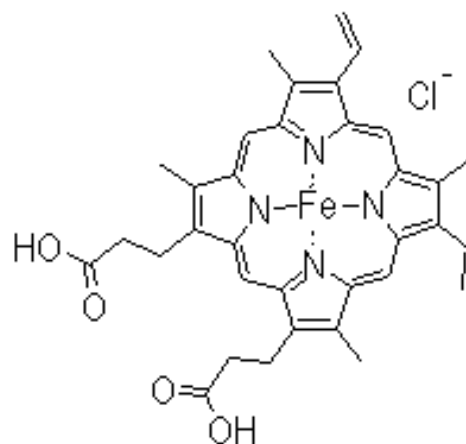


Fig. 3. Estrutura do heme (Ferro Protoporfirina IX). O heme consta de uma parte orgânica e um átomo de ferro. A parte orgânica, denominada protoporfirina IX, é formada por um anel tetrapirrólico e o ferro está ligado no centro deste anel. (www.frontiersci.com).

O heme funciona como grupamento prostético de várias proteínas, e sua função é determinada pelo polipeptídeo ligado a ele. Ligado à hemoglobina e à mioglobina, o heme é utilizado para transporte e armazenamento de oxigênio, respectivamente, enquanto que em citocromos ele está envolvido no transporte de elétrons, geração de energia e transformação química. Nas catalases e peroxidases, o heme atua na inativação ou ativação de peróxido de hidrogênio, respectivamente (Dawson 1988). Além disso, o heme é indispensável em outros sistemas enzimáticos, incluindo ciclooxygenase (COX) e óxido nítrico sintase (NOS). O heme também é importante no controle da expressão de várias proteínas, como globina, enzimas envolvidas na biossíntese do próprio heme, citocromos, mieloperoxidase, heme oxigenase-1 e receptor de transferrina (Wagener, Volk et al. 2003).

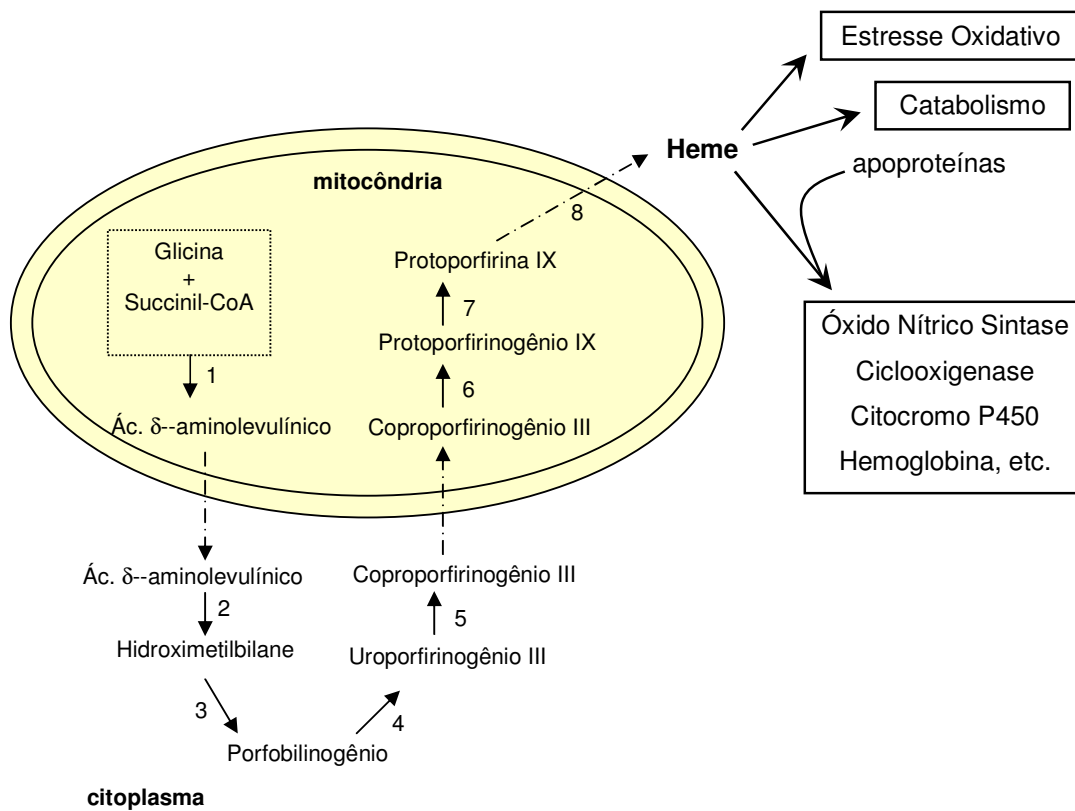


Fig. 4. Biossíntese do heme. A formação do heme a partir de glicina e succinil-CoA envolve a participação seqüencial de oito enzimas diferentes: 1) δ-aminolevulinato sintase (ALA-S); 2) δ-aminolevulinato desidratase (ALA-D); 3) porfobilinogênio deaminase (PBGD); 4) uroporfirinogênio III sintase (URO-S); 5) uroporfirinogênio III descarboxilase (URO-D); 6) coproporfirinogênio III oxidase (CPO); 7) protoporfirinogênio III oxidase (PPO); e 8) ferroquelatase (FC). O heme recém-sintetizado pode ser incorporado às hemoproteínas ou pode ser degradado. Acúmulo de heme intracelular ou exógeno pode ser prejudicial para as células, pois o heme catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio, resultando em estresse oxidativo. Adaptado de (Wagener, Volk et al. 2003).

Em contraste às funções fisiológicas do heme, parece que um excesso de heme livre pode causar dano celular e injúria tecidual, uma vez que esta molécula catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que resulta em estresse oxidativo (Jeney, Balla et al. 2002); (Sassa 2004). Além disso, diversos estudos têm mostrado que o heme pode atuar como uma molécula pró-inflamatória, aumentando a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e em leucócitos. Wagener e colegas demonstraram que o heme aumenta significativamente a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (Wagener, Feldman et al. 1997); (Wagener, da Silva et al. 1999). Em células endoteliais e leucócitos de camundongos, o heme induz fortemente a expressão de ICAM-1, fibronectina e P-selectina. Em adição, os autores observaram um influxo intenso de leucócitos em diversos órgãos de camundongos que receberam injeção i.v. de heme (Wagener, Eggert et al. 2001b).

Graça-Souza e colegas mostraram que a injeção intratorácica de heme em ratos induz uma reação inflamatória e acúmulo intenso de neutrófilos nas cavidades pleurais destes animais. Além disso, o heme induz a migração de neutrófilos humanos *in vitro*, dispara o burst oxidativo e promove polimerização de actina, indicando que heme é um potente ativador de neutrófilos (Graça-Souza, Arruda et al. 2002). Mais tarde, Arruda e colaboradores demonstraram que o heme livre é capaz de retardar a apoptose de neutrófilos humanos *in vitro*, em concentrações encontradas durante eventos hemolíticos *in vivo*. Este efeito foi dependente da atividade da heme oxigenase-1 e da geração de espécies reativas de oxigênio. Estes dados sugerem que o heme pode contribuir para o desenvolvimento de inflamação crônica associada com episódios hemolíticos, retardando a apoptose e promovendo a sobrevivência de neutrófilos (Arruda, Rossi et al. 2004).

Assim, o heme exerce um papel ambíguo: em pequenas quantidades ele atua como grupamento funcional de várias hemoproteínas, sendo indispensável para diversas funções celulares; em quantidades excessivas, o heme livre pode causar dano tecidual severo. Por isso, a quantidade de heme livre deve ser rigorosamente controlada para manter a homeostase celular e evitar o desenvolvimento de condições patológicas (Wagener, Volk et al.

2003). Isso implica na necessidade de um sistema eficiente de catabolismo desta molécula. De fato, o heme induz a síntese da heme oxigenase-1 (HO-1), enzima responsável por sua degradação.

A HO-1 (também conhecida como hsp32) é a forma indutível da enzima que quebra o anel de porfirina do heme, gerando quantidades equimolares de biliverdina, ferro livre (Fe^{+2}) e monóxido de carbono (CO). A biliverdina é rapidamente reduzida a bilirrubina, através da ação da enzima biliverdina redutase (Maines 1997). O ferro liberado da molécula do heme induz a expressão de ferritina, uma proteína seqüestradora de ferro, assim com uma bomba ATPase que ativamente remove o ferro intracelular da célula (Fig. 5) (Otterbein, Soares et al. 2003). Foram identificadas três isoformas de heme oxigenase: HO-1, HO-2 e HO-3. As três isoformas foram altamente conservadas entre as espécies durante a evolução. A HO é expressa em virtualmente todas as formas de vida; tanto em bactérias como em fungos, plantas e seres humanos, regulando diversos processos celulares. Sob condições fisiológicas, a maioria das células expressa níveis baixos ou indetectáveis da proteína HO-1, enquanto as proteínas HO-2 e HO-3 são constitutivamente expressas. A expressão do gene da HO-1 é fortemente induzida por agentes ou condições que aumentam o estresse oxidativo, incluindo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), metais pesados, hipóxia, hiperóxia, choque térmico, isquemia, radiação UV, óxido nítrico, citocinas e o seu substrato, heme (Maines 1997); (Wagener, Volk et al. 2003).

Numerosos estudos têm demonstrado que a HO-1 apresenta efeitos antiinflamatórios, diminuindo a expressão de moléculas de adesão e enzimas pró-inflamatórias, como COX-2 (Vachharajani, Work et al. 2000); (Vicente, Guillén et al. 2003). Alguns destes efeitos parecem ser mediados pela inibição da atividade de fatores de transcrição críticos para a expressão de genes pró-inflamatórios, como NF- κ B (Soares, Seldon et al. 2004). Além disso, a HO-1 medeia os efeitos antiinflamatórios da IL-10, tanto *in vivo* como *in vitro*, em camundongos (Lee and Chau 2002). Em adição, a expressão da HO-1 está significativamente aumentada nas células inflamatórias durante a fase de resolução da inflamação (Willis, Moore et al. 1996). A HO-1 também parece ser importante na proteção contra a toxicidade das hemoproteínas *in vivo*, já

que camundongos que não expressam HO-1 apresentam falência renal aguda e mortalidade acentuada quando recebem doses de hemoglobina que não são nefrotóxicas para camundongos selvagens (Nath, Haggard et al. 2000).

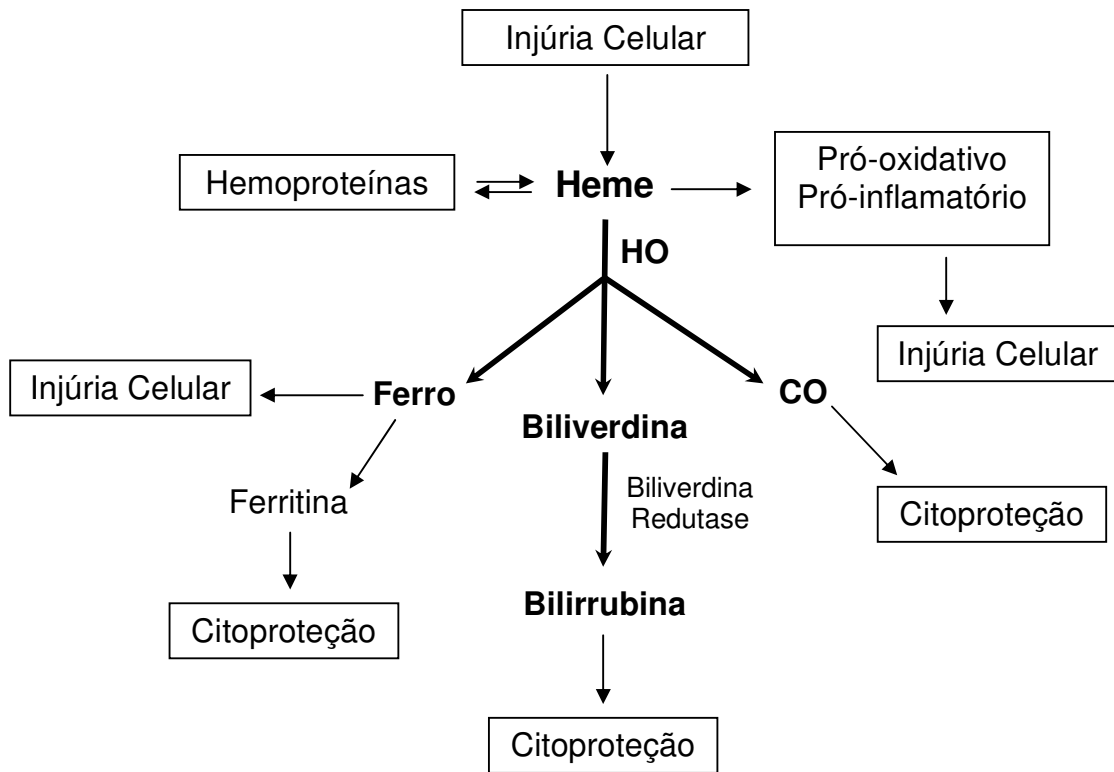


Fig. 5. Degradação do heme pela heme oxigenase (HO). O heme derivado das hemoproteínas ou recém-sintetizado é degradado pela HO em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro. A biliverdina é convertida em bilirrubina pela ação da biliverdina redutase. O ferro é diretamente sequestrado pela ferritina. Os produtos de quebra do heme possuem diversas propriedades fisiológicas. Adaptado de (Wagener, Volk et al. 2003).

Além das ações antiinflamatórias demonstradas pela própria HO-1, há evidências crescentes de que os produtos de quebra do heme demonstram efeitos citoprotetores. Estudos recentes têm demonstrado que o tratamento com biliverdina aumenta a sobrevivência de animais recipientes de aloenxertos, diminui as respostas aloimunes de linfócitos T e a infiltração de neutrófilos, e a expressão de citocinas pró-inflamatórias. O mecanismo pelo qual a biliverdina exerce estes efeitos antiinflamatórios parece ser a inibição da ativação de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e NF- κ B (Yamashita, McDaid et al. 2004); (Nakao, Otterbein et al. 2004). A administração de bilirrubina demonstrou ser citoprotetora em modelos de estresse oxidativo (Dore, Takahashi et al. 1999); (Clark, Foresti et al. 2000). Além disso, o tratamento com bilirrubina resultou em sobrevivência aumentada e injúria hepática atenuada em resposta à infusão de LPS em ratos. Os níveis séricos de óxido nítrico (NO) e TNF- α , e a expressão de iNOS hepática foram significativamente mais baixos nos animais tratados com bilirrubina, em comparação com os animais controles (Wang, Smith et al. 2004).

Como a produção de monóxido de carbono (CO) pode refletir um aumento na expressão da HO-1 durante condições de estresse oxidativo, Horvath e colegas investigaram os níveis de CO exalado por pacientes com bronquiectasia, uma doença pulmonar inflamatória associada à produção aumentada de oxidantes, devido à infiltração neutrofílica. Os autores relataram que os pacientes com a doença apresentavam níveis mais elevados de CO exalado em comparação com os indivíduos controles, sugerindo que a medida de CO exalado pode atuar como um marcador da inflamação e estresse oxidativo em pacientes com bronquiectasia (Horvath, Loukides et al. 1998). Por outro lado, o CO parece estar envolvido na redução da resposta inflamatória no pulmão asmático. Em um modelo murino de asma, a administração de CO exógeno diminuiu significativamente o número de leucócitos infiltrantes no lavado broncoalveolar, incluindo eosinófilos, e a produção de IL-5, sugerindo que o CO pode funcionar como modulador da resposta inflamatória alérgica na asma (Chapman, Otterbein et al. 2001). Além disso, o CO é capaz de inibir a expressão das citocinas pró-inflamatórias

TNF- α , IL-1 β e MIP (proteína inflamatória de macrófagos)-1 β , e de aumentar a produção da citocina antiinflamatória IL-10, em um modelo de inflamação induzida por LPS (Otterbein, Bach et al. 2000). Assim, o CO poderia ser usado no tratamento do choque séptico e outras desordens inflamatórias.

Além da enzima HO-1, há uma série de proteínas plasmáticas que são capazes de ligar o heme livre circulante, com a finalidade de controlar os efeitos deletérios desta molécula. A hemopexina (Hpx), junto com a haptoglobina (Hp) e transferrina, formam o quarto grupo mais abundante de proteínas plasmáticas depois da albumina, imunoglobulinas e proteases plasmáticas. A Hpx é uma proteína ligadora de heme de 60kDa e que apresenta uma alta afinidade pelo heme ($K_d < 1\text{pM}$). A Hpx é sintetizada principalmente pelas células parenquimais hepáticas, mas os neurônios do sistema nervoso periférico, as células ganglionares e o ovário também constituem sítios de síntese de Hpx (Delanghe and Langlois 2001). O receptor de hemopexina foi identificado como uma proteína relacionada ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LRP/CD91) (Hvidberg, Maniecki et al. 2005). Os receptores de hemopexina são expressos principalmente nos hepatócitos, mas eles também foram detectados em células polimorfonucleares, macrófagos, células epiteliais pigmentares da retina, fibroblastos, neurônios, adipócitos e em algumas células de linhagens pró-mielocíticas, como HL-60 e U937 (Delanghe and Langlois 2001) (Hvidberg, Maniecki et al. 2005). Os complexos heme-Hpx ligam-se aos receptores de hemopexina nas células parenquimais hepáticas e são então endocitados. Assim, o heme chega ao citoplasma para ser degradado pela HO e a Hpx é devolvida intacta à circulação depois de ter liberado o heme intracelularmente. Além disso, a ligação do complexo heme-Hpx ao receptor de Hpx estimula a expressão do gene da HO-1 (Delanghe and Langlois 2001).

Foi demonstrado que a Hpx desempenha um papel protetor importante durante eventos hemolíticos, uma vez que camundongos que não expressam Hpx apresentam uma recuperação mais lenta, dano renal mais severo e hemoglobinúria após hemólise, em comparação com os animais controles (Tolosano, Hirsch et al. 1999).

Assim como a Hpx, a albumina também liga diretamente ao heme, porém com menor avidéz. Por outro lado, albumina está presente no plasma em quantidades muito maiores que a Hpx. Assim, a albumina também funciona com um “scavenger” de heme, porque captura o heme livre, transportando-o para o fígado, onde ele será degradado pela HO-1 (Noyer, Immenschuh et al. 1998). Porém, ainda não foi esclarecido se os complexos heme-albumina são reconhecidos por receptores específicos na superfície das células.

A Haptoglobina (Hp) é a principal proteína plasmática que liga a hemoglobina (Hb) livre, com uma grande afinidade ($K_d \sim 1\text{pM}$). Através da rápida formação de complexos Hp-Hb, a Hp marca a Hb livre para que seja degradada nos hepatócitos, reduzindo o dano renal induzido pela Hb (Lim, Jenner et al. 2000). Recentemente, uma proteína expressa em macrófagos, CD163, foi identificada como um receptor que seqüestra a hemoglobina livre, mediando a endocitose de complexos Hp-Hb (Kristiansen, Graversen et al. 2001). Tanto a expressão do CD163, como a da Hp são aumentadas por mediadores da resposta de fase aguda, como IL-6 (Kristiansen, Graversen et al. 2001). A endocitose de complexos Hp-Hb mediada por CD163 induz a degradação lisossomal da proteína ligante e metabolismo do heme pela HO citosólica. Assim, a expressão aumentada de Hp, CD163 e HO-1 durante a resposta de fase aguda, leva à regulação da inflamação através de dois mecanismos: 1) a sinalização mediada por CD163 resulta em mobilização de Ca^{+2} intracelular, produção de inositol trifosfato e secreção aumentada de citocinas antiinflamatórias; 2) a liberação intracelular de Hb mediada por CD163 no macrófago leva à degradação do heme pela HO-1, e os produtos de quebra do heme têm potentes efeitos antiinflamatórios (Moestrup and Moller 2004).

A Hp parece ser um importante agente antioxidante que age principalmente no tecido renal, durante hemólise. Camundongos deficientes de Hp (Hp^{-/-}) apresentam dano renal e estresse oxidativo renal mais pronunciados, com perda da função do órgão durante hemólise, em comparação com os animais selvagens (Lim, Jenner et al. 2000). Além disso, camundongos deficientes de Hp-Hpx (Hp^{-/-} Hpx^{-/-}) têm esplenomegalia,

inflamação hepática acentuada e fibrose durante hemólise aguda induzida por fenilhidrazina, sugerindo que a Hp e a Hpx podem influenciar o processo inflamatório gerado por desordens hemolíticas (Tolosano, Fagoonee et al. 2002).

1.8. Desordens Hemolíticas, Heme e Inflamação

A hemólise pode ser elevada em condições que aumentam a fragilidade das hemácias, em sítios de fluxo sanguíneo turbulento nas artérias, em pacientes com próteses intracardíacas ou em condições patológicas, como anemias hemolíticas, anemia falciforme, talassemias, certas infecções virais, bacterianas ou por parasitas.

Diversas doenças infecciosas (como a malária e a leptospirose) e não-infecciosas (como a anemia falciforme) são complicadas por miólise ou hemólise e conseqüentemente os tecidos podem ser expostos a grandes quantidades de heme livre. A quantidade de heme livre pode aumentar após uma sobrecarga extracelular de heme, síntese aumentada de heme, degradação acelerada de hemoproteínas, incorporação diminuída em apo-hemoproteínas ou por causa de baixa atividade da HO-1, resultando em níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente estresse oxidativo e dano celular.

1.8.1. Malária

A malária é uma doença hemolítica causada por um parasita. A malária causa de 1 a 3 milhões de mortes por ano. A malária cerebral é a principal causa de morte pelo *Plasmodium falciparum*, uma de quatro espécies que infectam seres humanos. Alguns indivíduos infectados com *P. falciparum* desenvolvem essa complicação e entram em coma. Um quarto desses indivíduos não responde à terapia antimalária e morre sem retomar a consciência. Embora a patogênese precisa da malária cerebral ainda seja controversa, acredita-se que os mecanismos de defesa do hospedeiro sejam

críticos para determinar se os indivíduos infectados com *P. falciparum* desenvolverão malária cerebral (Hunt and Stocker 2007). A infecção pelo *Plasmodium* elicita no hospedeiro uma resposta imune inata que está criticamente envolvida na patogênese da doença, uma vez que o *Plasmodium* expressa na sua superfície um glicolípido que é reconhecido por receptores da família Toll (TLR-2/TLR-1 ou TLR-2/TLR-6) (Ferreira, Balla et al. 2008). A hemozoína, um cristal derivado do heme e gerado pelo *Plasmodium*, aumenta a expressão de TNF- α no sangue total e em macrófagos isolados, indicando que ela é capaz de estimular monócitos. Em adição, a injeção intraperitoneal de hemozoína induz a migração dose-dependente de neutrófilos e um alto nível de atividade da mieloperoxidase nas células peritoneais (Huy, Trang et al. 2006). Estes estudos sugerem que estruturas presentes no parasita e a hemozoína ativam a imunidade inata, participando na patogênese da malária severa.

As formas eritrocíticas do *Plasmodium* estão em íntimo contato com a hemoglobina, degradando de 60 a 80% do conteúdo total de hemoglobina da hemácia, para usar como fonte de aminoácidos. Entretanto, a degradação de hemoglobina gera heme livre e ROS, sendo que esta combinação é deletéria tanto para o parasita quanto para o hospedeiro (Ferreira, Balla et al. 2008). Recentemente foi descrito que o desenvolvimento de malária cerebral está associado com o acúmulo de altas concentrações de heme livre no plasma, que seria responsável pela ruptura da barreira hematoencefálica, favorecendo a entrada de proteínas plasmáticas, citocinas e antígenos do *Plasmodium* no cérebro (Pamplona, Ferreira et al. 2007).

1.8.2. Anemia Falciforme

A anemia falciforme é um exemplo de doença hemolítica não-infecciosa, que apresenta um certo grau de inflamação e onde as altas concentrações de heme livre intravascular podem desempenhar um papel-chave. A anemia falciforme é uma desordem sanguínea molecular que é causada pela substituição de um único aminoácido na cadeia β da hemoglobina (chamada HbS). A HbS polimeriza com a desoxigenação, produzindo uma hemácia em forma de foice, que é menos deformável e que

pode obstruir os vasos sanguíneos. Além dos problemas clínicos característicos da doença, as oclusões vasculares são a principal causa de dor, morbidade e mortalidade associadas a esta desordem. Pacientes que sofrem de anemia falciforme exibem uma inflamação crônica de baixo grau que é associada com expressão aumentada de moléculas de adesão em células endoteliais ativadas, leucócitos e reticulócitos (Wagener, Abraham et al. 2001a). Foi demonstrado que as hemácias falciformes têm um efeito direto sobre as células endoteliais, iduzindo um aumento na produção de moléculas de adesão por estas células, o que cria um ambiente vascular que favorece eventos de adesão (Shiu, Udden et al. 2000). Além disso, evidências crescentes sugerem a presença de interações célula endotelial-reticulócito e célula endotelial-leucócito na doença (Turhan, Weiss et al. 2002). Assim, em adição à mutação pontual em um gene que codifica a Hb, a adesão aumentada de células sanguíneas à parede dos vasos tem importância significativa na patogênese desta desordem (Wagener, Abraham et al. 2001a).

A Hb mutada (HbS) torna a hemácia frágil, mais propensa à hemólise, o que resulta em grandes concentrações de Hb e heme livres, os quais podem interagir com o endotélio (Wagener, Abraham et al. 2001a). Foi demonstrado que o heme induz a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina em células endoteliais (Wagener, Feldman et al. 1997). Deste modo, o heme derivado das hemácias falciformes pode levar à vaso-occlusão através da indução de moléculas de adesão e aderência de células sanguíneas ao endotélio. Além disso, a primeira linha de defesa contra os efeitos deletérios do heme e/ou Hb, hemopexina e haptoglobina, respectivamente, frequentemente encontra-se diminuída em pacientes com anemia falciforme. Isto resulta em perda da proteção contra a adesão induzida pelo heme (Wagener, Abraham et al. 2001a).

1.8.3. Injúria de Isquemia-Reperusão

A injúria de isquemia-reperusão pode ocorrer em várias condições clínicas, incluindo choque hemorrágico, infarto do miocárdio, diversos procedimentos cirúrgicos ou durante a procura de órgãos para transplante (Fondevila, Busutil et al. 2003); (Eltzschig e Collard, 2004). As conseqüências

da privação do suprimento sanguíneo a um órgão são críticas para o resultado dessas condições clínicas. Embora a restauração do fluxo sanguíneo a um órgão isquêmico seja essencial para prevenir uma injúria tecidual irreversível, a reperfusão por si resulta em resposta inflamatória local e sistêmica (Eltzschig e Collard, 2004).

A injúria de isquemia-reperfusão é caracterizada por ativação de leucócitos (principalmente neutrófilos), quimiotaxia, adesão leucócito-célula endotelial e transmigração. Uma vez no compartimento extravascular, os neutrófilos ativados produzem ROS, proteases e elastases, resultando em permeabilidade vascular aumentada, edema, trombose e morte de células parenquimais. O acúmulo de neutrófilos também é facilitado pela IL-8 liberada pelos tecidos hipóxicos, resultando num gradiente quimiotático, que direciona estas células para os tecidos afetados (Eltzschig e Collard, 2004). A elastase dos neutrófilos parece desempenhar um papel crítico no desenvolvimento da injúria hepática induzida por isquemia e reperfusão, através da diminuição da produção de óxido nítrico e prostaciclina, o que leva a uma redução no fluxo sanguíneo hepático. Essa redução é resultante da inibição da vasodilatação e indução de injúria microvascular estimulada por neutrófilos ativados (Okajima, Harada et al. 2004).

As citocinas iniciam e mantêm a resposta inflamatória durante a injúria de reperfusão. TNF- α e IL-1 são as duas citocinas mais comumente implicadas na injúria de isquemia-reperfusão hepática (Serracino-Inglott, Habib et al. 2001). As duas citocinas têm potentes ações pró-inflamatórias: elas induzem a síntese de IL-8 e aumentam a expressão de moléculas de adesão (como selectinas e β -integrinas), levando ao aumento das interações leucócito-célula endotelial, o que resulta em maior produção de citocinas (Serracino-Inglott, Habib et al. 2001); (Jaeschke 2003). Além disso, a IL-1 estimula a produção de ROS por neutrófilos (Serracino-Inglott, Habib et al. 2001).

A reperfusão de tecidos isquêmicos resulta na formação de ROS, como ânions superóxido, radicais hidroxila (OH \cdot), ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio. As espécies reativas de oxigênio causam injúria tecidual de várias maneiras. Como elas são potentes agentes oxidantes e redutores, as ROS danificam diretamente as membranas celulares através de peroxidação

lipídica. As ROS também estimulam a ativação e a quimiotaxia de leucócitos, induzindo a formação de ácido araquidônico mediada pela fosfolipase A₂. O ácido araquidônico é precursor dos mediadores lipídicos, como o LTB₄. Além disso, as ROS estimulam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e citocinas, através da ativação de fatores de transcrição, como NF-κB e AP-1 (Eltzschig e Collard, 2004).

A ativação do sistema complemento é um evento crucial durante a isquemia-reperfusão em animais experimentais e em humanos. A cascata do complemento pode ser rapidamente ativada pela liberação extensiva de proteínas celulares durante a fase inicial da reperfusão. Os fatores do complemento, como C5a, aumentam a expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos circulantes e induzem o recrutamento dessas células. Além disso, C5a induz a produção de ROS por neutrófilos (Jaeschke 2003). Além das citocinas inflamatórias e fatores do complemento, quimiocinas e mediadores lipídicos têm sido implicados na fisiopatologia da isquemia-reperfusão. Diversos estudos têm demonstrado a importância das quimiocinas CXC, MIP-2, KC e CINC-1, na injúria de isquemia-reperfusão hepática (Hisama, Yamaguchi et al. 1996); (Lentsch, Yoshidome et al. 1998). O fator ativador de plaquetas (PAF) é formado principalmente pelas células endoteliais em modelos experimentais e em humanos durante a injúria de isquemia-reperfusão e induz a geração de ROS por neutrófilos, além de induzir a quimiotaxia dessas células (Jaeschke 2003). O leucotrieno B₄ pode contribuir para a amplificação da resposta neutrofílica durante a reperfusão, uma vez que ele é produzido em grandes quantidades por neutrófilos na fase de injúria induzida por essas células, depois da isquemia (Jaeschke 2003). De fato, o LTB₄ parece ser um dos principais mediadores que levam ao acúmulo de neutrófilos e disfunção renal em um modelo de isquemia-reperfusão renal em ratos (Noiri, Yokomizo et al. 2000). Em contradição a esses estudos, foi demonstrado que a ativação dos receptores BLT desempenha um papel pequeno nos danos locais e sistêmicos induzidos por um modelo de isquemia-reperfusão intestinal (Souza, Pinho et al. 2002).

A expressão da HO-1 é estimulada por diversos fatores, incluindo estresse oxidativo, hipóxia e isquemia (Wagener, Volk et al. 2003). Estudos

recentes têm demonstrado que a HO-1 atua como um potente agente citoprotetor em diferentes modelos de injúria tecidual ou celular. A administração de cobalto protoporfirina IX (CoPPIX), um indutor da expressão de HO-1, resultou na melhora da função renal em animais sujeitos à lesão de isquemia-reperfusão renal. Por outro lado, a administração de estanho protoporfirina IX (SnPPIX), inibidor da expressão de HO-1, exacerbou a disfunção renal nos animais sujeitos à injúria de isquemia-reperfusão (Gonçalves, Cenedeze et al. 2006).

1.9. A Descoberta da Existência de Receptores para Heme

Durante muitos anos, vários autores postularam que, devido à sua natureza hidrofóbica, o heme poderia facilmente intercalar a membrana celular e prejudicar a bicamada lipídica e outras organelas, como a mitocôndria e o núcleo e desestabilizar o citoesqueleto (Balla, Jacob et al. 1991); (Ryter and Tyrrel 2000). Porém, evidências crescentes têm mostrado que diversos tipos celulares, animais e humanos, possuem receptores específicos, capazes de ligar heme. Além disso, a ligação do heme nesses receptores é capaz de induzir diversas vias de sinalização intracelular e estimular diferentes funções nas células.

Em 1985, Galbraith e colaboradores demonstraram a existência de um receptor para heme na membrana plasmática de células de eritroleucemia murina (MEL). A ligação de alta afinidade do heme a células MEL intactas foi saturável, dependente de pH e degradada por tripsina, sugerindo a existência de uma proteína ligadora de heme, em vez de uma interação físico-química difusional com a bicamada lipídica. Galbraith demonstrou a ligação do heme em células de hepatoma humano (HepG2) (Galbraith 1990). Worthington e colegas caracterizaram uma proteína transportadora de heme em células intestinais e em hepatócitos (Worthington, Cohn et al. 2001). Estes estudos mostram a existência de receptores para heme em células murinas e humanas, mas não identificam as proteínas específicas capazes de ligar heme nestas células.

Estudos recentes identificaram proteínas de superfície celular específicas que diretamente interagem com heme. O receptor para o vírus da leucemia felina tipo C (FLVCR) é um membro da superfamília de proteínas transportadoras e é responsável pelo transporte de heme citoplasmático em células eritróides. O FLVCR humano é requerido para o desenvolvimento dessas células e para protegê-las da toxicidade do heme. A inibição desse receptor diminui o transporte do heme, para a maturação eritróide e leva à apoptose (Quigley, Yang et al. 2004). A proteína de membrana HCP-1 (proteína carreadora de heme-1) foi identificada como um importador intestinal de heme. O mRNA da HCP-1 foi altamente expresso na mucosa duodenal, principal sítio de absorção de heme (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005). A proteína transportadora da família ABC, ABCB6, é associada com a membrana externa da mitocôndria e interage especificamente com heme e porfirinas para transportá-los do citoplasma para dentro da mitocôndria. Esse processo é importante para o controle da biossíntese de heme (Krishnamurthy, Du et al. 2006).

O nosso grupo demonstrou que o heme é capaz de induzir a produção de TNF- α por macrófagos e células dendríticas de maneira dependente do receptor TLR-4, CD14 e proteína de diferenciação mielóide-88 (MyD88) (Figueiredo, Fernández et al. 2007).

Considerando que o heme induz a migração de neutrófilos *in vitro* e que moléculas quimiotáticas, independentemente da sua natureza, ativam GPCR, nós hipotetizamos que o heme ativa um GPCR para induzir a migração de neutrófilos.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

Caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na inflamação desencadeada por heme.

2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito do heme e de moléculas análogas na migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*;
- Caracterizar o efeito do sangue na migração de neutrófilos *in vivo*;
- Avaliar o envolvimento de vias de sinalização de quimioatraentes na migração e na produção de ROS por neutrófilos induzidas por heme;
- Analisar o efeito de antagonistas de receptores quimiotáticos sobre a migração e a geração de ROS por neutrófilos induzidas por heme;
- Analisar os sistemas geradores de ROS ativados por heme, necessários para a migração de neutrófilos;
- Avaliar o efeito do heme sobre a permeabilidade vascular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

O heme (Ferro-Protoporfirina IX), Estanho-Protoporfirina IX, Manganês-Protoporfirina IX, Cobalto-Protoporfirina IX, Mesoporfirina, Ferro-Mesoporfirina e Paládio-Mesoporfirina foram obtidos comercialmente da Porphyrin Products, Inc. A Protoporfirina IX foi obtida da Aldrich. A Zinco-Protoporfirina IX foi proveniente da ICN Biomedicals, Inc. O DPI, Alopurinol, Apocinina e N-Acetilcisteína (NAC) foram obtidos comercialmente da Sigma. O meio RPMI 1640 foi proveniente da LGC Biotecnologia. O soro fetal bovino (FCS) e a solução salina de Hanks (HBSS) foram obtidos comercialmente da Hyclone. O Histopaque-1077, LPS (O111:B4) e Tioglicolato foram obtidos da Sigma-Aldrich. O LTB₄, PAF, LY255283, U-75302 e LY294002 foram obtidos da Cayman Chemical. A Toxina Pertussis (PTX), U-73122, Y-27632, SB203580, PD98058 e Bis-Indoilmaleimida IV foram provenientes da Calbiochem. 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) foi obtido comercialmente da Molecular Probe. O Zileuton e o CP105,696 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Cláudio Canetti, Instituto de Biofísica, UFRJ. O FCCP foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Pedro L. Oliveira, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ.

3.2. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos das linhagens C57/BL6, C57/BL10 e C57/BL10 ScCr, com idade entre 6 e 8 semanas e pesando em torno de 20 gramas. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia do IMPPG em temperatura constante (25°C) e com ciclos de 12 horas de luz/escuridão. O cuidado e o manuseio dos animais estavam de acordo com as normas do Comitê de Ética da UFRJ.

3.3. Soluções-estoque de Heme e seus Análogos

Nos experimentos de migração de neutrófilos *in vivo*, as soluções-estoque de heme e moléculas análogas (3mg/mL) foram feitas em NaOH 0,1N, filtradas e diluídas em solução salina apirogênica imediatamente antes do uso. Nos experimentos de migração de neutrófilos *in vitro*, as soluções-estoque de heme e análogos (5mM) foram feitas em NaOH 0,1N, filtradas e diluídas em meio RPMI 1640 imediatamente antes do uso.

3.4. Indução do Recrutamento de Neutrófilos *in vivo*

O recrutamento de neutrófilos *in vivo* foi induzido com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de heme (3-300µg/cavidade), sangue (200µL), protoporfirina IX (PPIX; 6-600µg/cavidade), zinco-PPIX, estanho-PPIX, manganês-PPIX, cobalto-PPIX, mesoporfirina, ferro-mesoporfirina ou paládio-mesoporfirina (100µg/cavidade) em um volume de 200µL. Os animais do grupo controle receberam uma injeção i.p. de solução salina apirogênica no mesmo volume. Após 4 horas, os animais foram sacrificados e as cavidades peritoneais foram lavadas com 3mL de PBS gelado. O número de leucócitos totais presentes no fluido peritoneal foi contado em câmara de Neubauer, após diluição com Turk. Além disso, os leucócitos presentes no fluido peritoneal foram citocentrifugados, fixados e corados com o kit Diff-Quick (Baxter Travenol Laboratories), para que fosse feita a contagem diferencial das células recrutadas em microscópio óptico, sob objetiva de imersão.

Nos experimentos cujo objetivo foi determinar o efeito do sangue na migração de neutrófilos, o sangue foi coletado de camundongos C57/BL6 e os neutrófilos e células mononucleares foram contados. Ao lavado peritoneal coletado dos animais injetados com sangue foram acrescentados 9mL de água deionizada gelada e 3mL de KCl 0,6M gelado para a lise das hemácias, e o número de neutrófilos e células mononucleares injetadas foi descontado.

Nos experimentos cujo objetivo foi avaliar o papel do receptor TLR-4 no recrutamento de neutrófilos induzido por heme, camundongos *tlr4+/+* e *tlr4-/-* foram injetados i.p. com heme (60µg/cavidade) em um volume de 200µL. Os grupos controle receberam uma injeção i.p. de salina apirogênica ou LPS (0,5µg/cavidade) no mesmo volume.

3.5. Purificação de Neutrófilos Humanos

Os neutrófilos foram coletados do sangue periférico de voluntários humanos sadios em seringas heparinizadas. O sangue foi diluído 2X em solução salina de Hanks (HBSS), adicionado lentamente sobre um gradiente de Ficoll (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS.) (10 mL de Ficoll para 20 mL de sangue) e centrifugado a 1100 rpm, por 45 minutos em temperatura ambiente. Após este período, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 9 mL de água deionizada gelada e 3 mL de cloreto de potássio 0,6M gelado ao pellet formado por hemácias e granulócitos, para a lise das hemácias. Os neutrófilos foram então ressuspensos em meio RPMI 1640 1% FCS. A viabilidade dos neutrófilos foi avaliada através do ensaio de exclusão com azul de trypan. Para analisar a pureza dos neutrófilos, uma alíquota das células purificadas foi citocentrifugada, fixada e corada e foi feita a contagem das células em microscópio óptico.

3.6. Ensaio de Quimiotaxia de Neutrófilos

Os ensaios de quimiotaxia foram feitos em microplacas de quimiotaxia de 96 poços (ChemoTx System, NeuroProbe, Inc.) ou em sistema Transwell (Corning), usando uma membrana de policarbonato de 5µm.

Os indutores da quimiotaxia de neutrófilos foram adicionados nos poços inferiores da placa em meio RPMI 1640, na presença de 1% de soro fetal

bovino (FCS), em um volume de 300 μ L. Os neutrófilos suspensos em meio RPMI 1640 foram adicionados nos poços superiores da placa (5x10⁴ células/50 μ L) e incubados por 2 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após a incubação, os neutrófilos que migraram para os poços inferiores foram coletados e contados em câmara de Neubauer. A migração dos neutrófilos em direção ao meio RPMI 1640 sozinho (migração randômica) foi utilizada como controle negativo e a migração em direção ao Leucotrieno B₄ (1nM) foi usada como controle positivo. O índice quimiotático foi calculado como sendo o número de células que migraram em direção ao estímulo dividido pelo número de células que migraram em direção ao meio RPMI 1640 sozinho. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Para avaliar o envolvimento de proteína G inibitória, PI3K, MAPK (ERK e p38), PLC- β , RhoK, NADPH oxidase, xantina oxidase, mitocôndria, BLT1 e BLT2 na migração de neutrófilos induzida por heme, os neutrófilos humanos foram pré-tratados com inibidores seletivos dessas vias de sinalização por períodos de tempo determinados, conforme indicam as legendas das figuras.

3.7. Ensaio de Geração de Espécies Reativas de Oxigênio

Os neutrófilos humanos (10⁶ células/microtubo) foram pré-tratados com inibidores seletivos de: proteína G (PTX; 100ng/mL por 2 horas), PI3K (LY294002; 50 μ M por 30 min.), PLC- β (U-73122; 1 μ M por 1 hora), PKC (Bis-Indoilmaleimida IV; 10nM por 1 hora), RhoK (Y-27632; 1 μ M por 2 horas), p38 (SB203580; 10 μ M por 1 hora), ERK (PD98059; 30 μ M por 1 hora), NADPH oxidase (Apocinina; 1 μ M por 30 min.), flavoproteínas (DPI; 100 μ M por 30 min.), complexo I mitocondrial (Rotenona; 1 μ M por 30 min.), Xantina oxidase (Alopurinol; 1 μ M por 30 min.), desacoplador da mitocôndria (FCCP; 1 μ g/mL por 30 min.), antioxidante não-seletivo (N-Acetilcisteína - NAC; 1mM por 30 min.) ou com antagonistas de BLT1 (CP105,696; 10nM por 2 horas ou U-75302; 10 μ M por 2 horas) e BLT2 (LY-255283; 10 μ M por 2 horas) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a pré-incubação, os neutrófilos foram estimulados com heme (30 μ M) por 1 hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e incubados com

5-(e 6-) clorometil-2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil éster (CM-H₂DCFDA) em solução salina de Hank's por 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. A produção de ROS foi analisada por citometria de fluxo, usando FACSCalibur (BD Biosciences).

3.8. Ensaio de Permeabilidade Vascular in vivo

Os hamsters foram anestesiados com uma injeção i.p. de pentobarbital de sódio suplementado com α -cloralose i.v. (2,5% peso/volume em solução salina) através de um catéter na veia femoral. Uma cânula traqueal foi inserida para facilitar a respiração espontânea e a temperatura corporal foi mantida em 37°C. O "cheek pouch" (HCP) foi evertido e montado em uma placa no microscópio, e uma área de 1cm² foi preparada para observações da microcirculação por microscopia intravital. Após 30 minutos, *fluorescein-labeled* dextran (FITC-dextran - 100 mg/Kg de peso corporal) foi injetado i.v. e utilizado como traçador macromolecular. O HCP foi continuamente perfundido com uma solução salina tamponada com HEPES-bicarbonato (pH 7,4), numa taxa constante de 5 mL/minuto. A microcirculação do HCP foi acessada usando um microcópico Axioskop 40 com objetiva de 4X e oculares de 10X (Zeiss), equipado com filtros de 490/520 nm para observações da fluorescência. As imagens foram capturadas com uma câmera digital (AxioCamHRc; Zeiss) e processadas com o programa AxioVision 4.4 (Zeiss). Cada imagem de uma área de 5 mm² consistiu de 1.388 X 1.040 pixels. As imagens gravadas no computador consistiram de 8.37MB cada e foram armazenadas concomitantemente com os dados técnicos, com data e hora da exposição. O programa AxioVision 4.4 foi usado para as medições do diâmetro arteriolar e fluorescência total numa área retangular representativa (5 mm²) do HCP preparado (aproximadamente 1 cm²), com uma ou duas arteríolas variando de 20 a 60 μ m de diâmetro sendo aptas para as medições. Para as comparações, o diâmetro no final do período controle de 30 minutos (tempo 0) foi fixado em 100%. Após a injeção i.v. de FITC-dextran, as imagens da microvasculatura foram gravadas em intervalos de 5 minutos durante todo o período experimental.

Após a injeção i.v. de FITC-dextran e um período inicial controle de 30 minutos para estabelecer o fluxo sanguíneo normal e as condições da permeabilidade vascular, a perfusão do HCP foi interrompida e o heme (5-20 μM) em um volume de 250 μL de salina foi aplicado na área do HCP durante 9 minutos até que a perfusão foi reiniciada.

3.9. Método para Análise dos Resultados

Os resultados obtidos foram analisados com a ajuda do programa *GraphPad Prism 5*, utilizando o Teste t de Student e o Teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados foram representados como média \pm EPM e foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Moléculas análogas ao heme são quimiotáticas para neutrófilos in vitro.

Graça-Souza e colaboradores (2002) mostraram que o heme é capaz de induzir a migração de neutrófilos tanto *in vitro* como *in vivo*. Nesta tese, nós utilizamos o heme e diversos análogos para determinar os motivos estruturais necessários para a indução da migração de neutrófilos. Inicialmente, nós caracterizamos o efeito de diferentes concentrações de heme na migração de neutrófilos *in vitro*. O heme induz a migração de neutrófilos, de forma dependente de concentração, com a dose de 3 μM induzindo a melhor resposta (Fig. 6A). A falta do átomo de ferro não afetou a capacidade da protoporfirina IX induzir a migração dos neutrófilos de maneira dose-dependente (Fig. 6B). Este resultado sugere que o anel porfirínico é a parte essencial na molécula do heme envolvida na ativação de neutrófilos. Por outro lado, a mesoporfirina IX não foi capaz de induzir a quimiotaxia de neutrófilos (Fig. 6C). A mesoporfirina IX tem uma estrutura similar a da protoporfirina IX, mas faltam os dois grupamentos vinil, que são substituídos por grupos etila. Estes dados indicam que a indução da migração de neutrófilos *in vitro* por heme e seus análogos requer a presença dos grupos vinil, mas não do átomo de ferro.

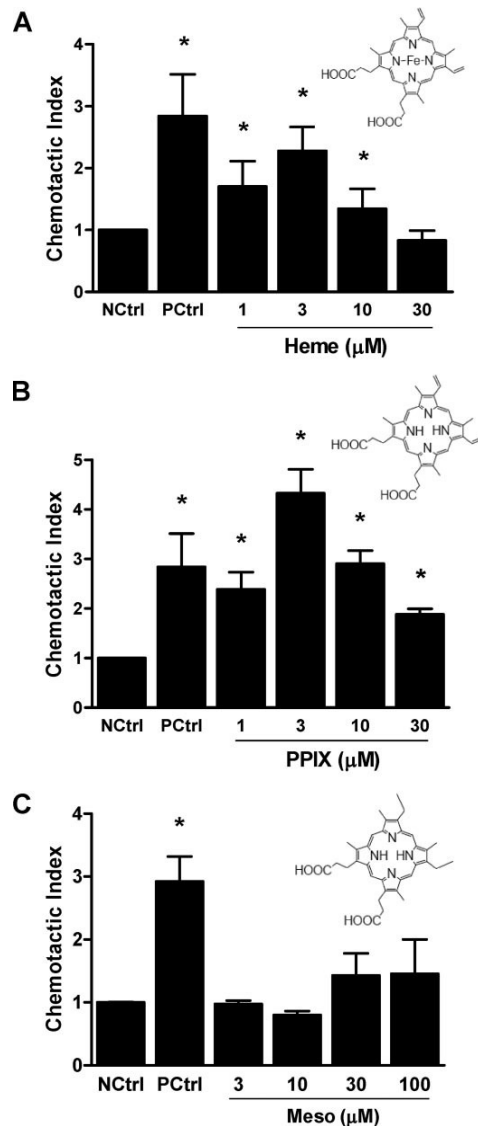


Fig. 6. Moléculas análogas ao heme são quimiotáticas para neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos humanos foram estimulados a migrar em direção a diferentes concentrações de (A) heme (1-30 μM), (B) protoporfirina IX (1-30 μM) ou (C) mesoporfirina IX (3-100 μM) na presença de 1% FCS por 2 horas a 37°C. O controle negativo (NCtrl) foi meio RPMI 1640 e o controle positivo (PCtrl) foi LTB₄ (1nM). Depois da incubação, as células que migraram foram contadas e o índice quimiotático foi calculado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata para cada amostra e são expressos como média \pm EPM. * $P < 0.05$ comparado ao controle negativo.

4.2. O efeito do heme é seletivo para neutrófilos.

A partir dos resultados de migração de neutrófilos *in vitro*, nós resolvemos analisar o efeito de diferentes doses de heme no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Para isso, os animais foram injetados i.p. com doses crescentes (3-300 μg /cavidade) de heme. Os animais do grupo controle receberam uma injeção i.p. de salina apirogênica. Após 4 horas, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS gelado e as células presentes no fluido peritoneal foram contadas. Como mostra a Fig. 7A, o heme foi capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos *in vivo*, de maneira dose-dependente.

Nós investigamos se o heme seria capaz de induzir também o recrutamento de células mononucleares para o peritônio dos animais. O efeito do heme (30 μg /cavidade) foi seletivo para neutrófilos, uma vez que não houve aumento no número de células mononucleares recrutadas para a cavidade peritoneal dos camundongos, de 90 minutos a 48 horas após a injeção (Fig. 7B).

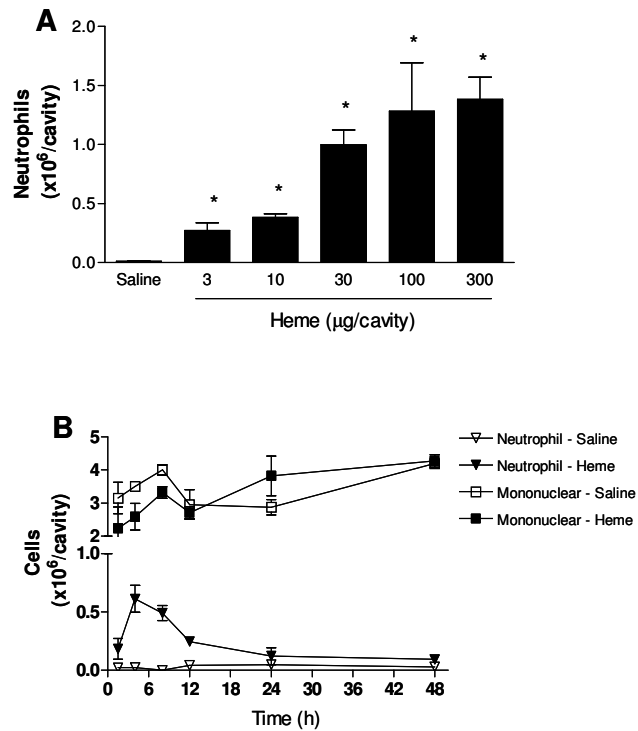


Fig. 7. O efeito do heme é seletivo para neutrófilos. (A) Camundongos foram injetados i.p. com diferentes doses de heme (3-300 µg/cavidade). Após 4 horas, os animais foram sacrificados e as contagens diferenciais no fluido peritoneal foram determinadas. (B) Camundongos foram injetados com heme (30 µg/cavidade). Após 1, 5, 8, 12, 24 e 48 horas, os animais foram sacrificados e as contagens celulares no fluido peritoneal foram feitas. Os animais do grupo controle receberam solução salina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e expressos como média ± EPM do número de células no fluido peritoneal. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.3. Moléculas análogas ao heme são quimiotáticas para neutrófilos *in vivo*.

Visando esclarecer os motivos estruturais na molécula do heme necessários para o recrutamento de neutrófilos *in vivo*, diferentes moléculas análogas ao heme foram injetadas i.p. em camundongos.

A protoporfirina IX induziu o recrutamento de neutrófilos *in vivo*, de forma dependente de dose (Fig. 8A). Moléculas análogas ao heme, com substituições nos metais ligados ao anel porfirínico, também foram capazes de induzir a migração de neutrófilos *in vivo* (Fig. 8B). Assim, parece que o metal ligado ao anel tetrapirrólico não é a parte fundamental para a indução da migração de neutrófilos por heme e moléculas análogas.

Em contraste, as mesoporfirinas não foram capazes de induzir a migração de neutrófilos *in vivo* (Fig. 8C). Estes resultados confirmam os achados dos ensaios *in vitro*, que mostram que o efeito do heme sobre a migração de neutrófilos é dependente da presença dos grupos vinil na sua estrutura, mas não da presença do átomo de ferro.

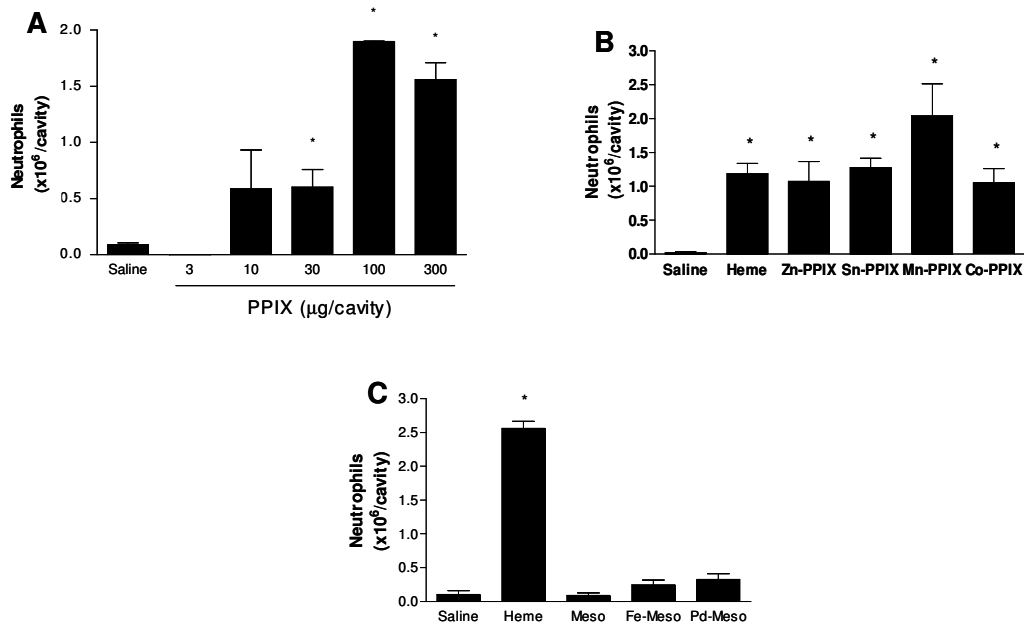


Fig. 8. Moléculas análogas ao heme são quimiotáticas para neutrófilos *in vivo*. (A) Diferentes doses de protoporfirina IX (3-300 µg/cavidade) foram injetadas i.p. em camundongos. Camundongos receberam uma injeção de (B) Zn-protoporfirina IX, Sn-protoporfirina IX, Mn-protoporfirina IX, Co-protoporfirina IX (100 µg/cavidade) ou (C) mesoporfirina IX, Fe-mesoporfirina IX, Pd-mesoporfirina IX (100 µg/cavidade). O grupo controle foi injetado com solução salina. Após 4 horas, as contagens diferenciais no fluido peritoneal foram determinadas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e expressos como média ± EPM do número de células no fluido peritoneal. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.4. A mesoporfirina IX inibe a migração de neutrófilos induzida por heme *in vitro*.

Com base nos resultados que mostram que as mesoporfirinas não são capazes de induzir a migração de neutrófilos *in vitro*, nós resolvemos investigar se estas moléculas poderiam atuar como antagonistas do heme. Para isso, neutrófilos humanos foram estimulados a migrar em direção à concentração ótima de heme (3 μM) ou em direção a concentrações crescentes de mesoporfirina IX (3-30 μM) na presença da concentração ótima de heme. Quando o heme foi adicionado junto com concentrações crescentes de mesoporfirina IX, uma inibição completa da migração dos neutrófilos induzida por heme foi observada. (Fig. 9A), o que sugere que a mesoporfirina IX pode atuar como antagonista do heme. Por outro lado, quando a mesoporfirina foi adicionada com outro agente quimiotático para neutrófilos, o PAF, não foi observada inibição da migração (Fig. 9B), sugerindo que o efeito inibitório da mesoporfirina IX é seletivo para o heme.

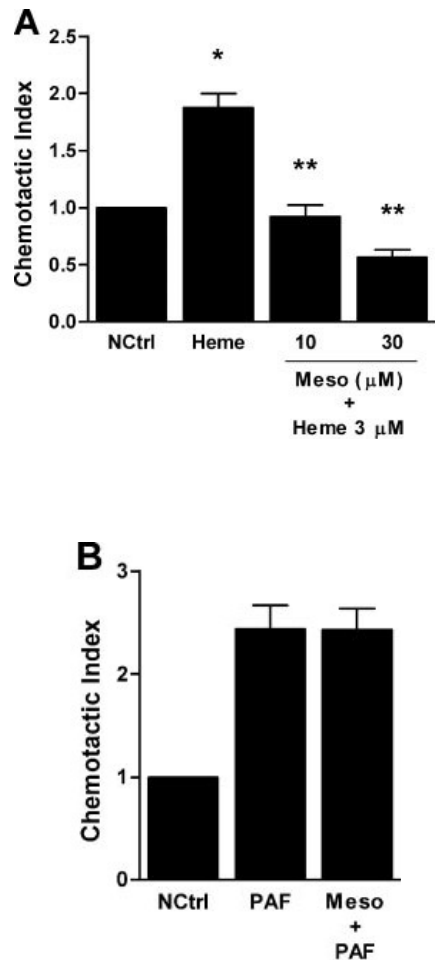


Fig.9. A mesoporfirina IX inibe a migração de neutrófilos induzida por heme *in vitro*. (A) Neutrófilos humanos foram estimulados a migrar em direção ao heme (3 μ M) ou em direção a diferentes concentrações de mesoporfirina IX (3-10 μ M) + heme (3 μ M) por 2 horas a 37°C. Após a incubação, as células que migraram foram contadas e o índice quimiotático foi calculado. (B) Neutrófilos migraram em direção ao PAF (1 μ M) ou em direção à mesoporfirina IX (30 μ M) + PAF (1 μ M). Os dados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata para cada amostra e são expressos como média \pm EPM. * $P < 0.001$ comparado ao controle negativo; ** $P < 0.001$ comparado aos neutrófilos estimulados com heme.

4.5. A mesoporfirina IX inibe o recrutamento de neutrófilos induzido por heme ou sangue.

Desordens hemolíticas e hemorrágicas estão associadas a uma resposta inflamatória intensa, caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos, os quais podem causar lesão tecidual. Para mimetizar um evento hemorrágico e esclarecer o mecanismo envolvido no recrutamento de neutrófilos induzido por hemorragia, camundongos foram injetados i.p. com heme ou sangue. Após 4 horas, os neutrófilos presentes no fluido peritoneal foram contados. De maneira semelhante ao heme, a injeção de sangue foi capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos (Fig. 10A). Esse efeito foi abolido quando os animais receberam uma injeção i.p. de mesoporfirina IX imediatamente antes da injeção de heme ou de sangue (Fig. 10A). Esse resultado sugere que o efeito do sangue na migração de neutrófilos foi mediado pelo heme. Por outro lado, o tratamento com mesoporfirina IX não interferiu no recrutamento de neutrófilos induzido por outros agentes inflamatórios, como LPS ou tioglicolato (Fig. 10B), indicando mais uma vez que o efeito antagonista da mesoporfirina IX é seletivo para o heme.

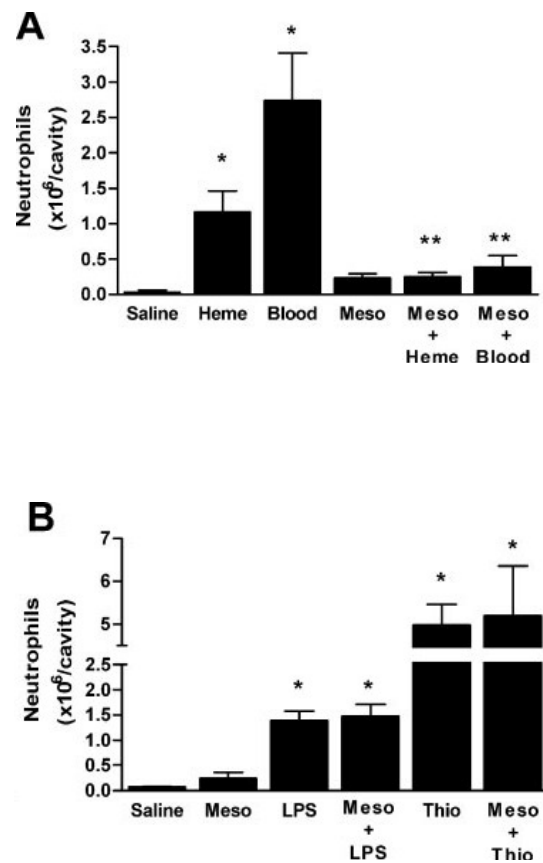


Fig. 10. A mesoporfirina IX inibe o recrutamento de neutrófilos induzido por heme ou sangue. (A) Camundongos foram injetados com heme (30 µg/cavidade), sangue (200 µL), mesoporfirina IX (100 µg/cavidade), mesoporfirina IX + heme ou mesoporfirina IX + sangue. (B) Camundongos receberam uma injeção de mesoporfirina IX (100 µg/cavidade), LPS (500 ng/cavidade), tioglicolato 3% (200 µL), mesoporfirina IX + LPS ou mesoporfirina IX + tioglicolato. Após 4 horas, os animais foram sacrificados e os neutrófilos presentes no fluido peritoneal foram contados. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e expressos como média ± EPM do número de células no fluido peritoneal. **P* < 0.05 comparado ao grupo controle; ***P* < 0.05 comparado aos grupos tratados com heme ou sangue.

4.6. O recrutamento de neutrófilos induzido por heme não depende de TLR-4.

Recentemente nós mostramos que o heme é capaz de induzir a secreção de TNF- α por macrófagos de maneira dependente da ativação do receptor TLR-4 (Figueiredo, Fernández et al. 2007).

Com o objetivo de caracterizar o papel do TLR-4 no recrutamento de neutrófilos induzido por heme, os camundongos C57/Bl10 ScCr, que apresentam uma deleção no gene *Tlr4* e não expressam o receptor TLR-4 (Poltorak, He et al. 1998), receberam uma injeção i.p. de heme (60 μ g/cavidade), LPS (0,5 μ g/cavidade) ou salina. Como controle, os camundongos selvagens receberam os mesmos tratamentos. Após 4 horas, as células presentes no lavado peritoneal foram contadas. Como mostra a Fig. 11, o heme induziu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais selvagens. Este efeito também foi observado nos animais que não expressam o TLR-4. Como era esperado, o LPS foi capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos para o peritônio dos animais selvagens, mas não induziu a migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais deficientes de TLR-4. Estes resultados indicam que o heme induz o recrutamento de neutrófilos *in vivo* de maneira independente do receptor TLR-4.

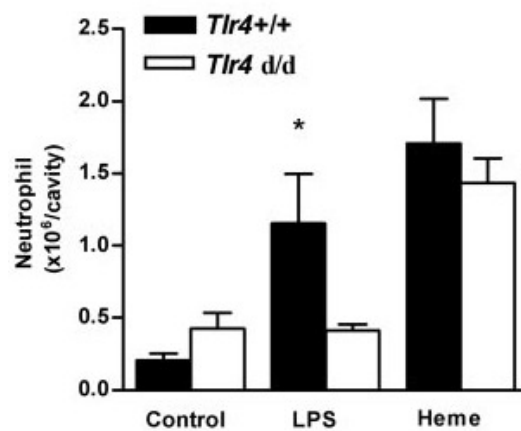


Fig. 11. O recrutamento de neutrófilos induzido por heme não depende de TLR-4. Camundongos *Tlr4*^{+/+} e *Tlr4*^{d/d} foram injetados i.p. com heme (60 µg/cavidade) ou LPS (0,5 µg/cavidade). O grupo controle recebeu uma injeção de salina apirogênica. Após 4 horas, os animais foram sacrificados e as contagens diferenciais no fluido peritoneal dos animais foram determinadas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e expressos como média ± EPM do número de células no fluido peritoneal. **P* < 0.05 comparado ao grupo tratado com salina.

4.7. O efeito do heme na migração de neutrófilos depende de vias de sinalização características de quimioatraentes.

Um estudo prévio mostrou que o heme induz a migração de neutrófilos *in vitro* de maneira dependente da ativação de PKC. Além disso, o heme induz a produção de ânion superóxido por essas células, bem como um aumento na expressão de mRNA de IL-8 (Graça-Souza, Arruda et al. 2002). Essa ativação parece apresentar algumas semelhanças com o mecanismo desencadeado por ligantes de receptores quimiotáticos. De fato, as diversas moléculas com característica quimiotática ativam receptores específicos da família de receptores acoplados a proteína G (GPCR).

Nós usamos a toxina pertussis (PTX) para avaliar o envolvimento da proteína $G\alpha_i$ na migração de neutrófilos induzida por heme. O pré-tratamento dos neutrófilos com PTX bloqueou a migração dessas células induzida por heme (Fig. 12A). Após isso, nós analisamos o envolvimento de vias de sinalização direta ou indiretamente reguladas pela subunidade $G\beta\gamma$. O pré-tratamento de neutrófilos com inibidores seletivos de PI3K (LY294002), PLC- β (U-73122), Rho quinase (Y-27632), ERK (PD98059) e p38 (SB203580) profundamente diminuíram a migração induzida por heme (Fig. 12B-E). A viabilidade celular no fim dos experimentos foi sempre maior do que 97% para os controles, assim como para as células tratadas com os inibidores. Estes resultados indicam o envolvimento de vias de sinalização disparadas pela ativação de receptores acoplados à proteína G_i .

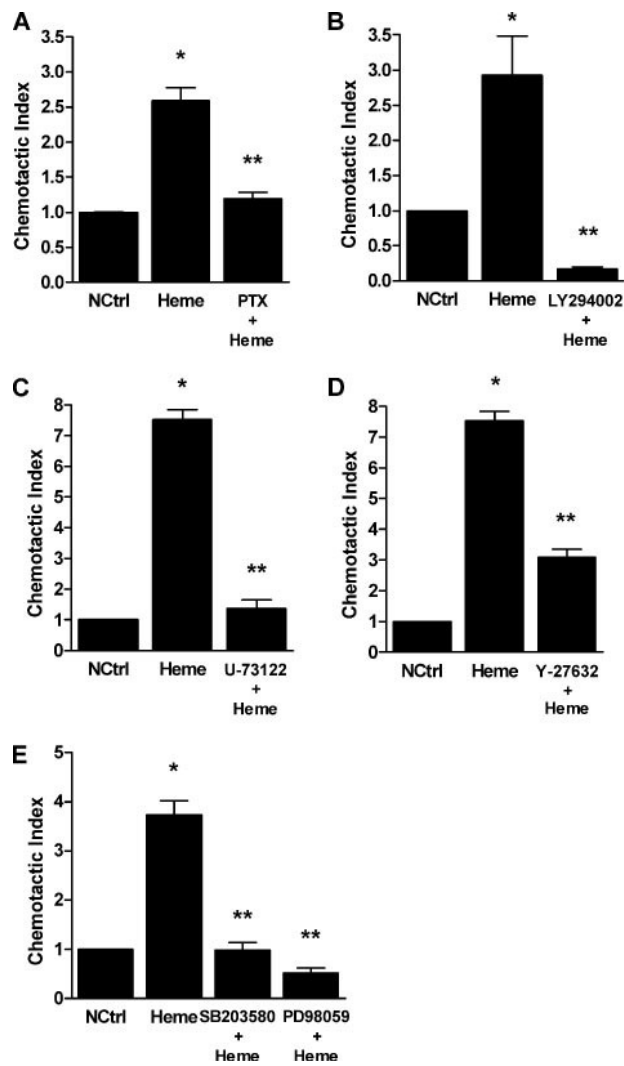


Fig. 12. O efeito do heme na migração de neutrófilos depende de vias de sinalização características de quimioatraentes. Neutrófilos humanos foram pré-tratados com: (A) toxina pertussis (100 ng/mL) por 2 horas; (B) inibidor de PI3K, LY294002 (50 μ M) por 30 minutos; (C) inibidor de fosfolipase C- β , U-73122 (1 μ M) por 1 hora; (D) inibidor de Rho quinase, Y-27632 (1 μ M), por 2 horas ou inibidores de MAPK, SB203580 (p38, 10 μ M) e PD98059 (ERK, 30 μ M) por 1 hora a 37°C e estimulados a migrar em direção ao heme (3 μ M). As células que migraram foram contadas e o índice quimiotático foi calculado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata para cada amostra e são expressos como média \pm EPM. * $P < 0.01$ comparado ao controle negativo; ** $P < 0.01$ comparado aos neutrófilos estimulados com heme.

4.8. A produção de ROS induzida por heme é dependente de proteína Gi e PI3K.

Nós utilizamos um painel de inibidores similar ao que usamos nos experimentos de quimiotaxia para definir as vias de sinalização envolvidas na geração de ROS induzida por heme em neutrófilos. Os neutrófilos foram pré-tratados com inibidores seletivos de proteína Gi, PI3K, PLC- β , PKC, Rho quinase, p38 e ERK. Após o pré-tratamento, as células foram estimuladas com heme (30 μ M) e incubadas com CM-H₂DCFDA. O CM-H₂DCFDA atravessa passivamente a membrana celular e uma vez no citoplasma é clivado por esterases intracelulares. Os produtos desta reação são retidos no interior celular e oxidados a sua forma fluorescente pelas ROS. A fluorescência pode ser detectada utilizando citometria de fluxo.

O pré-tratamento com PTX ou LY294002, inibidores de proteína Gi e PI3K, respectivamente, aboliu a geração de ROS induzida por heme em neutrófilos (Fig. 13A e B). Por outro lado, os inibidores de PLC- β (U-73122), PKC (Bis-Indoilmaleimida IV), RhoK (Y-27632), ou p38 (SB203580) parcialmente inibiram o efeito do heme na geração de ROS (Fig. 13C-F). O inibidor de ERK 1/2 (PD98059) não inibiu a produção de ROS induzida por heme em neutrófilos (Fig. 13G). Esses resultados indicam que a ativação de proteína G e PI3K é necessária para a geração de ROS induzida por heme. Assim, parece que o heme ativa vias de sinalização seletivas para a indução da produção de ROS em neutrófilos.

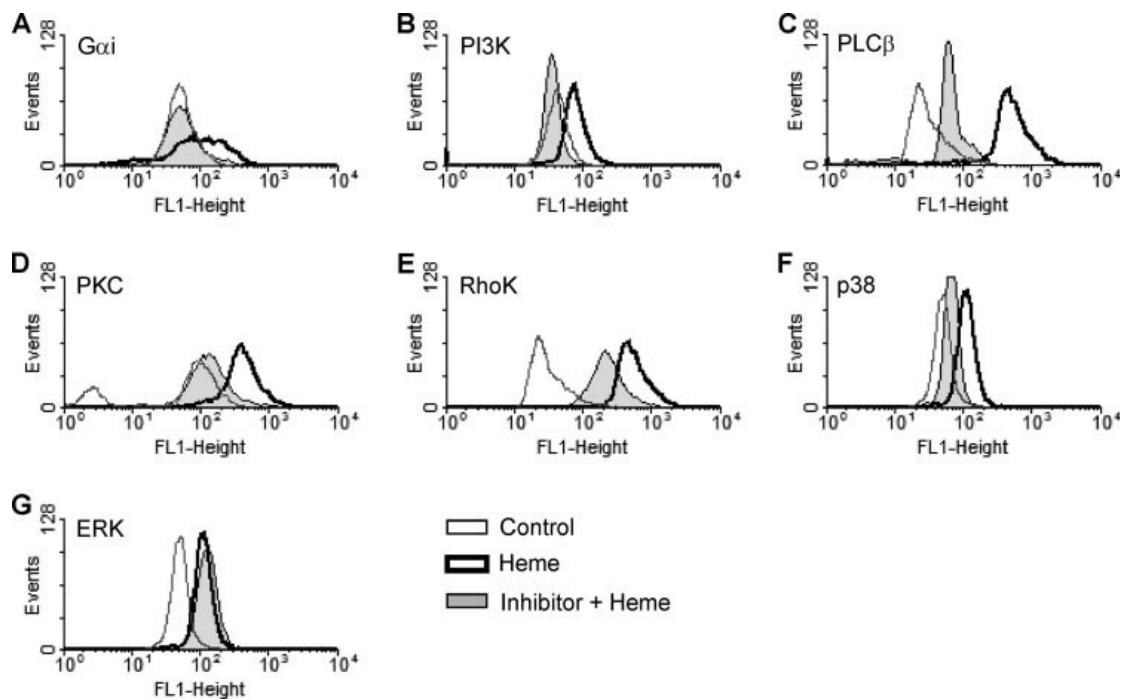


Fig. 13. A produção de ROS induzida por heme é dependente de proteína Gi e PI3K. Neutrófilos humanos foram pré-tratados com: (A) PTX (100ng/mL) por 2 h, (B) inibidor de PI3K, LY294002 (50 μ M) por 2 h, (C) inibidor de PLC- β , U-73122 (1 μ M) por 1 h, (D) inibidor de PKC, Bis-Indoilmaleimida IV (10nM) por 1 h, (E) inibidor de RhoK, Y-27632 (1 μ M) por 1 h, (F) inibidor de p38, SB203580 (10 μ M) por 1 h e (G) inibidor de ERK, PD98059 (30 μ M) por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, os neutrófilos foram estimulados com heme (30 μ M) por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e incubados com CM-H₂DCFDA (2 μ M) por 30 min. A produção de ROS foi analisada por citometria de fluxo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.9. A produção de ROS induzida por heme ocorre pela ativação da NADPH Oxidase.

Graça-Souza e colaboradores (2002) mostraram que o heme induz a geração de superóxido de maneira dose-dependente, através da ativação de flavoproteínas. Nós então resolvemos avaliar se o heme poderia estar ativando outros sistemas de geração de ROS em neutrófilos humanos. Os neutrófilos foram pré-tratados como um antioxidante não-seletivo (N-Acetilcisteína - NAC), inibidor do complexo I mitocondrial (Rotenona), inibidor seletivo da Xantina Oxidase (Alopurinol), inibidor seletivo da NADPH Oxidase (Apocinina), inibidor de flavoproteínas (DPI) ou com um desacoplador da mitocôndria (FCCP).

Conforme a Fig. 14B, o pré-tratamento com NAC aboliu a produção de ROS induzida por heme em neutrófilos. Por outro lado, o pré-tratamento com os inibidores do complexo I mitocondrial e da Xantina Oxidase não inibiu a geração de ROS induzida por heme (Fig. 14C e D). Curiosamente, o inibidor específico da NADPH Oxidase não foi capaz de inibir a produção de ROS induzida por heme, mas o DPI, que a inibe as flavoenzimas e, conseqüentemente acaba inibindo a NADPH Oxidase, foi capaz de inibir a geração de ROS (Fig. 14E e F). O desacoplador da mitocôndria também não inibiu a geração de ROS induzida por heme em neutrófilos (Fig. 14G). Esses resultados indicam que a mitocôndria e a Xantina Oxidase não estão envolvidas na produção de ROS induzida por heme em neutrófilos, mas apenas a via da NADPH Oxidase é importante nesse fenômeno.

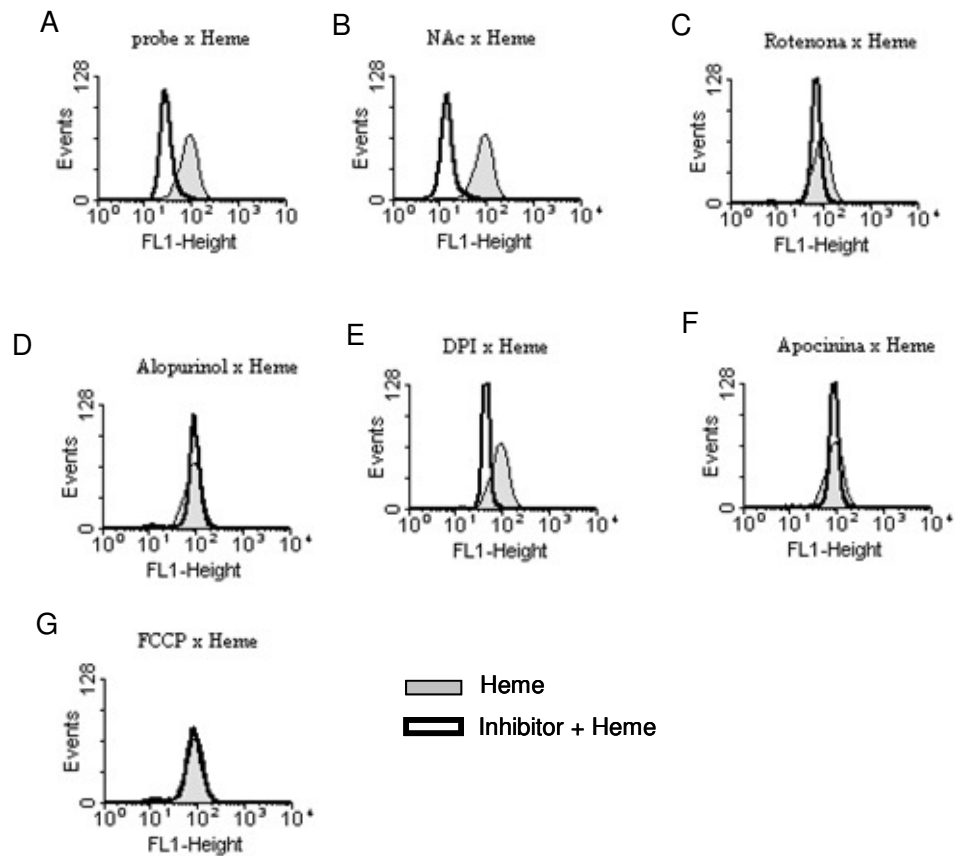


Fig. 14. A produção de ROS induzida por heme ocorre pela ativação da NADPH Oxidase. (A) Neutrófilos estimulados com meio RPMI 1640 e incubados com CM-H₂DCFDA (2μM) por 30 min (Controle). Neutrófilos humanos foram pré-tratados com: (B) NAC (1 mM), (C) Rotenona (1 μM), (D) Alopurinol (1 μM), (E) DPI (100 μM) por , (F) Apocinina (1 μM) ou (G) FCCP (1 μg/mL) por 30 minutos a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, os neutrófilos foram estimulados com heme (30μM) por 1 hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e incubados com CM-H₂DCFDA (2μM) por 30 minutos. A produção de ROS foi analisada por citometria de fluxo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.10. A migração de neutrófilos induzida por heme depende da geração de ROS pela NADPH oxidase.

Como o heme foi capaz de induzir a produção de ROS em neutrófilos, de maneira dependente da ativação da NADPH Oxidase, nós resolvemos investigar o papel das espécies reativas de oxigênio na migração de neutrófilos por heme e qual seria o sistema gerador das espécies reativas de oxigênio envolvido nesse efeito do heme. Sendo assim, os neutrófilos foram pré-tratados com N-Acetilcisteína (NAC), Rotenona, Alopurinol, Apocinina ou com DPI antes de serem estimulados a migrar em direção ao heme.

O antioxidante NAC inibiu parcialmente a migração dos neutrófilos induzida por heme, assim como os inibidores da NADPH Oxidase e de flavoproteínas (Fig. 15A e D). Por outro lado, os inibidores da Xantina Oxidase e do complexo I mitocondrial não tiveram efeito sobre a migração de neutrófilos (Fig. 15B e C). Esses resultados sugerem que a migração de neutrófilos induzida por heme é parcialmente dependente da produção de espécies reativas de oxigênio pela NADPH Oxidase e por flavoproteínas.

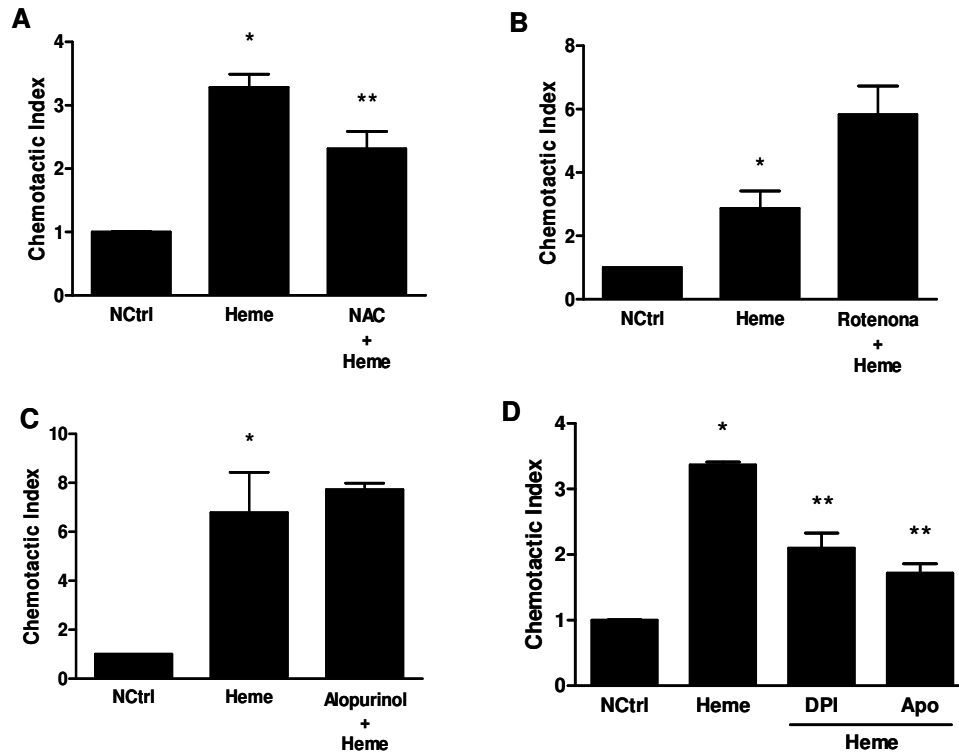


Fig. 15. A migração de neutrófilos induzida por heme depende da geração de ROS pela NADPH oxidase. Neutrófilos humanos foram pré-tratados com: (A) N-Acetilcisteína (NAC) (1 mM), (B) Rotenona (1 μ M), (C) Alopurinol (1 μ M), e (D) DPI (100 μ M) ou Apocinina (Apo) (1 μ M) por 30 minutos a 37°C a 5% de CO₂ e estimulados a migrar em direção ao heme (3 μ M) por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células que migraram foram contadas e o índice quimiotático foi calculado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata para cada amostra e são expressos como média \pm EPM. * $P < 0.05$ comparado ao controle negativo (NCtrl); ** $P < 0.05$ comparado aos neutrófilos estimulados com heme.

4.11. O motivo ligador de heme (CXXCH) está presente nos receptores BLT1 e BLT2.

Os nossos dados mostram que o heme induz a migração de neutrófilos de maneira dependente da ativação de vias de sinalização que são típicas de moléculas quimiotáticas (Fig.12). Diversos estudos recentes mostraram que o heme é capaz de ligar a receptores de superfície em células de mamíferos, alterando a fisiologia dessas células e ativando vias de sinalização específicas (Quigley, Yang et al. 2004); (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005); (Krishnamurthy, Du et al. 2006); (Figueiredo, Fernández et al. 2007). Tang e colaboradores demonstraram que o heme liga ao segmento intracelular CXXCH do canal Slo1 BK, inibindo sua frequência de abertura (Tang, Xu et al. 2003). O segmento CXXCH constitui o motivo ligador de heme tipicamente encontrado no citocromo c, já que o heme atua como grupamento prostético dessa proteína.

Com base nesses dados, nós analisamos as sequências de aminoácidos presentes nos receptores quimiotáticos expressos em neutrófilos e encontramos o motivo CXXCH em dois receptores: os receptores para LTB₄, BLT1 e BLT2 (Fig. 16A). No BLT1, esta sequência está localizada na borda externa do terceiro segmento transmembrana, enquanto no BLT2 a sequência está presente na borda externa do quinto segmento transmembrana (Fig. 16B). Assim, parece que o heme pode ser capaz de ligar à sequência CXXCH presente nos receptores BLT1 e BLT2, levando à quimiotaxia de neutrófilos.

A

QKCAQCHTVEKGGK Cytoc
 AGCRLCHYVCGVSM BLT1h
 RVCQLCHPSPVHAA BLT2h

B

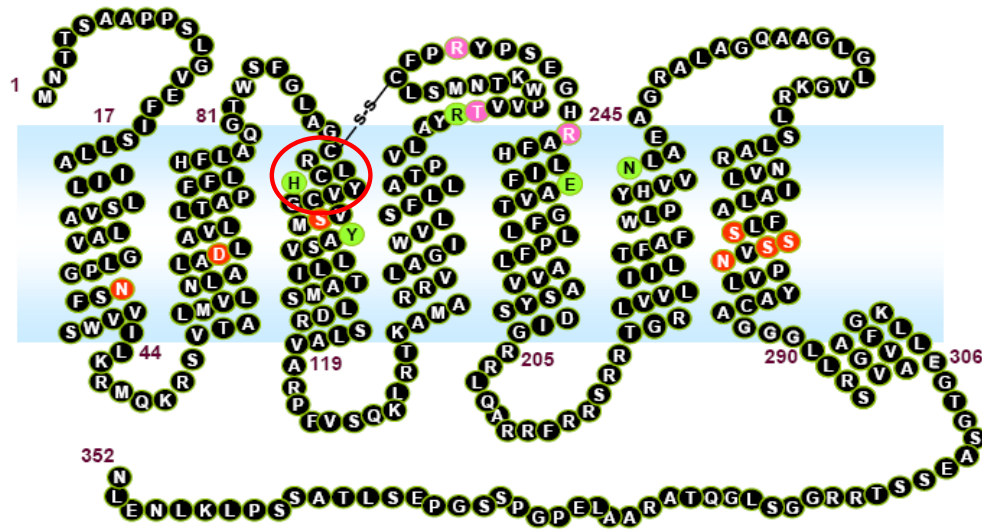


Fig. 16. O motivo ligador de heme (CXXCH) está presente nos receptores BLT1 e BLT2. (A) Identificação do motivo ligador de heme nos receptores BLT1 e BLT2. (B) Estrutura do receptor BLT1, mostrando no detalhe a sequência de ligação ao heme (CXXCH).

4.12. A migração de neutrófilos induzida por heme depende da ativação dos receptores BLT1 e BLT2.

Como nós encontramos o motivo ligador de heme (CXXCH) nos receptores BLT1 e BLT2, os dois receptores de LTB₄, resolvemos avaliar se a quimiotaxia de neutrófilos induzida por heme seria dependente da ativação desses receptores. Para isso, as células foram pré-tratadas com três antagonistas dos receptores: CP105,696 e U-75302, antagonistas do BLT1, e LY255283, antagonista do BLT2. Após esse período, os neutrófilos foram estimulados a migrar em direção ao heme ou ao LTB₄, como controle.

Como mostra a Fig. 17A, o heme induziu a migração de neutrófilos e o pré-tratamento com os antagonistas de BLT1 e BLT2 inibiram a migração induzida por heme. O LTB₄ também foi capaz de induzir a migração dos neutrófilos e, como era esperado, o pré-tratamento das células com os antagonistas aboliu a quimiotaxia induzida por LTB₄ (Fig. 17B). Esses resultados sugerem que o heme ativa os receptores BLT1 e BLT2 para induzir a quimiotaxia de neutrófilos.

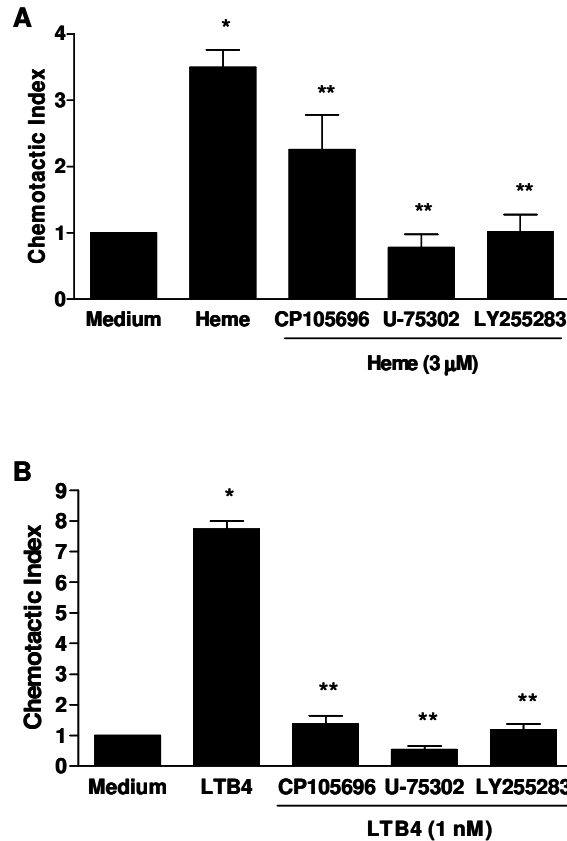


Fig.17. A migração de neutrófilos induzida por heme é dependente da ativação dos receptores BLT1 e BLT2. (A) Neutrófilos humanos foram pré-tratados com CP105,696 (10 nM), U-75302 (10 μM) ou LY255283 (10 μM) por 2 horas a 37°C e estimulados a migrar em direção ao heme (3 μM) por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. (B) Neutrófilos humanos foram pré-tratados com CP105,696 (10 nM), U-75302 (10 μM) ou LY255283 (10 μM) por 2 horas a 37°C e estimulados a migrar em direção ao LTB₄ (1 nM) por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células que migraram foram contadas e o índice quimiotático foi calculado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata para cada amostra e são expressos como média ± EPM. * $P < 0.05$ comparado ao controle negativo (medium); ** $P < 0.05$ comparado aos neutrófilos estimulados com heme ou LTB₄.

4.13. A geração de ROS induzida por heme em neutrófilos é dependente da ativação dos receptores BLT1 e BLT2.

Como a migração e a geração de ROS induzidas por heme em neutrófilos foram dependentes de vias de sinalização tipicamente ativadas por quimioatraentes e a migração também dependeu da ativação dos receptores BLT1 e BLT2, nós resolvemos investigar se o heme induziria a produção de ROS de maneira dependente dos receptores BLT1 e BLT2. Os neutrófilos foram pré-tratados com antagonistas do BLT1 (CP105,696 e U-75302) e com um antagonista do BLT2 (LY255283). Após isso, os neutrófilos foram estimulados com heme e incubados com CM-H₂DCFDA e a geração de ROS foi analisada por citometria de fluxo.

O heme foi capaz de induzir a geração de ROS pelos neutrófilos humanos e tanto o pré-tratamento com os antagonistas de BLT1 (Fig. 18A e B) como o pré-tratamento com o antagonista de BLT2 (Fig. 18C) foi capaz de inibir completamente a produção de ROS estimulada por heme. Assim, esses resultados indicam que o heme induz a geração de ROS por neutrófilos humanos de forma dependente da ativação dos receptores BLT1 e BLT2.

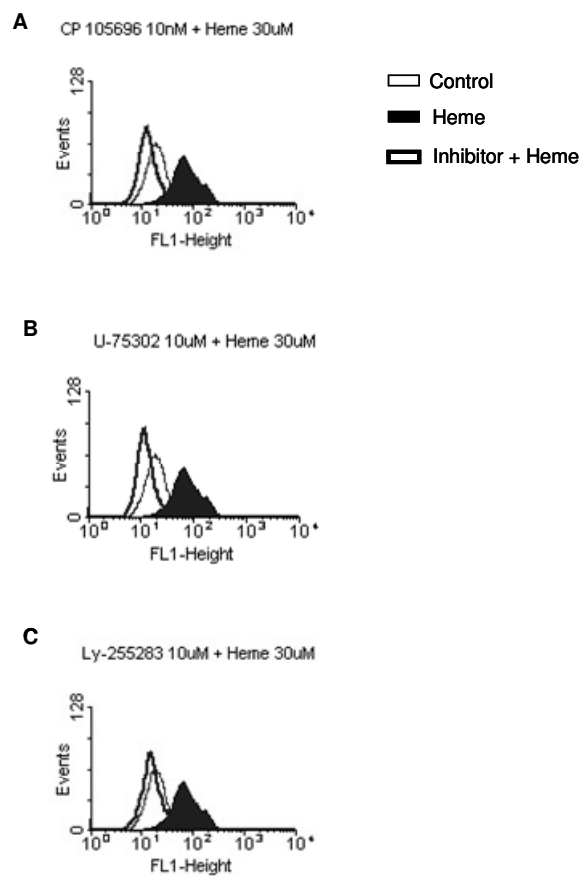


Fig.18. A geração de ROS induzida por heme em neutrófilos é dependente da ativação dos receptores BLT1 e BLT2. Neutrófilos humanos foram pré-tratados com: (A) CP105,696 (10nM), (B) U-75302 (10 μ M) ou (C) LY-255283 (10 μ M) por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, os neutrófilos foram estimulados com heme (30 μ M) por 1 hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e incubados com CM-H₂DCFDA (2 μ M) por 30 minutos. A produção de ROS foi analisada por citometria de fluxo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.14. A migração de neutrófilos induzida por heme é parcialmente dependente da produção de LTB₄.

Recentemente nós mostramos que o heme induz a secreção da quimiocina KC por macrófagos murinos *in vitro* (Figueiredo, Fernández et al. 2007). Nós então resolvemos investigar se o heme poderia estar induzindo a produção e secreção de algum fator quimiotático que estaria participando na indução da migração dos neutrófilos. Os neutrófilos foram pré-tratados com zileuton, inibidor da enzima 5-Lipoxigenase, que catalisa a formação de LTB₄ e cisteinil leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄). Após isso, os neutrófilos foram estimulados a migrar em direção ao heme ou ao LTB₄, como controle.

O heme foi capaz de induzir a quimiotaxia de neutrófilos e o pré-tratamento das células com zileuton inibiu parcialmente a migração induzida por heme (Fig. 19A). O LTB₄ induziu a migração dos neutrófilos, mas o pré-tratamento com zileuton não foi capaz de inibir a migração induzida por esse agente quimiotático (Fig. 19B). Esses resultados sugerem que o heme induz a secreção de LTB₄ por neutrófilos, e que o LTB₄ participa na indução da migração de neutrófilos por heme. Além do seu efeito direto sobre os neutrófilos, o heme também induz a secreção de um agente quimiotático que participa na migração dessas células induzida por heme.

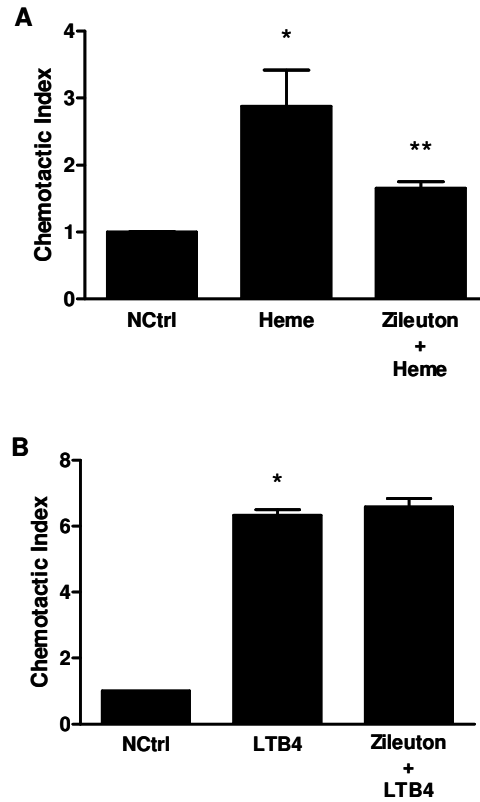


Fig.19. A migração de neutrófilos induzida por heme é parcialmente dependente da produção de LTB₄. (A) Neutrófilos humanos foram pré-tratados com Zileuton (50 µg/mL) por 30 minutos a 37°C e estimulados a migrar em direção ao heme (3 µM) por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. (B) Neutrófilos humanos foram pré-tratados com Zileuton (50 µg/mL) por 30 minutos a 37°C e estimulados a migrar em direção ao LTB₄ (1 nM) por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células que migraram foram contadas e o índice quimiotático foi calculado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata para cada amostra e são expressos como média ± EPM. * $P < 0.05$ comparado ao controle negativo (NCtrl); ** $P < 0.05$ comparado aos neutrófilos estimulados com heme ou LTB₄.

4.15. O heme induz aumento na permeabilidade vascular in vivo.

Para a migração transendotelial de leucócitos, incluindo neutrófilos, é necessário que ocorra um aumento na permeabilidade do endotélio. Sabe-se que peptídios vasoativos induzem aumento na permeabilidade vascular e perda da integridade endotelial, permitindo a passagem de leucócitos pelas células endoteliais (Gavard and Gutkind, 2008). Também já foi demonstrado que os fatores quimiotáticos, como o LTB₄, são capazes de induzir um aumento na permeabilidade vascular e o consequente recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (Woo, Yoo, et al. 2003). Considerando que o heme atua como um quimioatraente de neutrófilos, nós investigamos se ele seria capaz de induzir um aumento na permeabilidade vascular, causando extravasamento de plasma em “cheek pouchs” de hamsters.

Como mostra a Fig. 20, o heme induziu o aumento na permeabilidade vascular, observado pelo extravasamento de plasma, de maneira dependente de concentração (5-20 μ M). Esse efeito teve um começo muito rápido (em torno de 2 minutos após a aplicação do heme no “cheek pouch” do hamster) e se mostrou transitório, cessando após 60 minutos da aplicação. O heme foi aplicado 2 vezes no “cheek pouch”, a primeira aplicação mostrou um efeito mais marcado e a segunda aplicação induziu um extravasamento de plasma menor. Parece então que há uma dessensibilização ao heme no efeito sobre a permeabilidade. Levando em consideração os resultados que mostram que o heme induz a quimiotaxia de neutrófilos e a geração ROS através de vias de sinalização típicas de moléculas quimiotáticas e que o heme induz um aumento na permeabilidade vascular, nós podemos afirmar que o heme apresenta as mesmas propriedades dos fatores quimiotáticos.

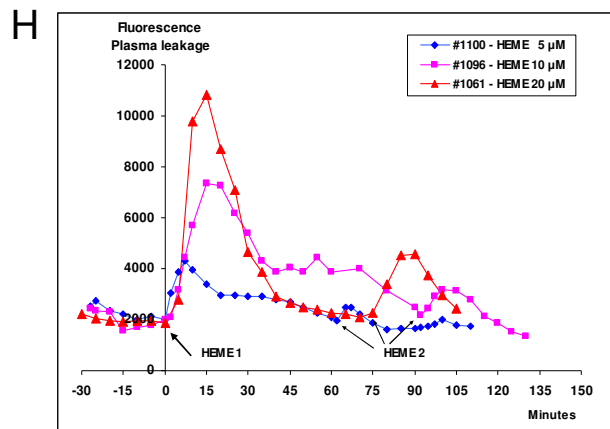
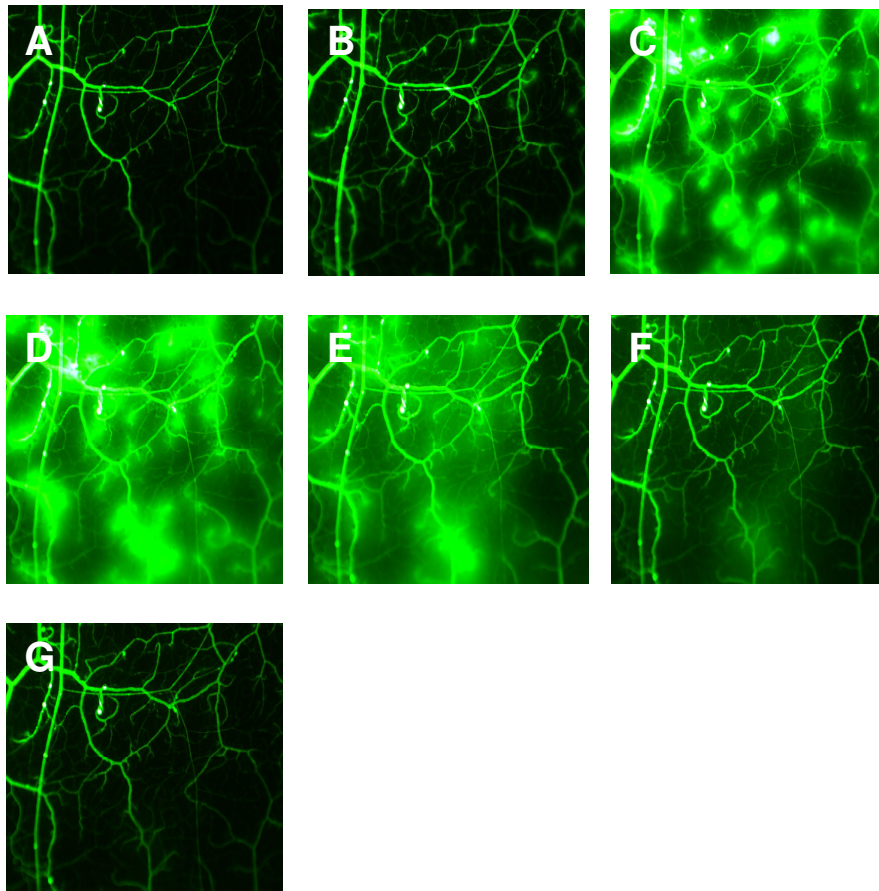


Fig. 20. O heme induz aumento na permeabilidade vascular *in vivo*. O heme foi aplicado em “cheek pouchs” de hamsters nas concentrações de 5, 10 e 20 μM . O aumento da permeabilidade vascular, observado pelo extravasamento de plasma, foi visualizado por microscopia intravital. (A) Microvasculatura visualizada antes da aplicação do heme (20 μM), (B) 5 min depois da aplicação do heme, (C) 10 min depois, (D) 15 min depois, (E) 20 min depois, (F) 30 min depois, (G) 60 min depois, (H) Efeito dose-resposta do heme sobre o extravasamento de plasma.

5. DISCUSSÃO

Doenças como a anemia falciforme, a anemia hemolítica, hemoglobinopatias, dengue e malária têm como característica a hemólise intra e extravascular elevada. A hemólise leva ao aparecimento de altas concentrações de heme livre. Estas desordens são frequentemente associadas a um processo inflamatório com infiltração de leucócitos, que podem causar lesão tecidual (Wagener, Volk et al. 2003). Neste trabalho, nós mostramos que, similar ao heme, diversas moléculas análogas ao heme foram capazes de induzir a migração de neutrófilo *in vitro* e *in vivo*. As mesoporfirinas, moléculas que não apresentam os grupos vinil nos anéis porfirínicos, não foram quimiotáticas e inibiram seletivamente a migração induzida por heme. Além disso, a migração de neutrófilos induzida por heme foi abolida pelo pré-tratamento com toxina pertussis, inibidor de proteína G α inibitória, e com inibidores de PI3K, PLC- β , MAPK ou RhoK. A indução de ROS por heme foi dependente de proteína G α inibitória e PI3K e parcialmente dependente de PLC- β , PKC, MAPK e RhoK. A análise de sequência dos receptores BLT1 e BLT2 revelou a presença do motivo ligador de heme (CXXCH) e tanto a migração de neutrófilos quanto a produção de ROS foram dependente desses receptores. Por outro lado, a migração de neutrófilos depende da secreção de LTB₄ induzida pelo próprio heme. Além disso, o heme induz aumento na permeabilidade vascular *in vivo*. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que o heme ativa neutrófilos através de vias de sinalização que são características de moléculas quimiotáticas e sugere que as mesoporfirinas podem ser úteis no tratamento das conseqüências inflamatórias de desordens hemolíticas e/ou hemorrágicas.

Diversos estudos indicaram a existência de proteínas de superfície celular em células mamíferas capazes de ligar heme, e alguns estudos recentes identificaram proteínas de superfície específicas que são capazes de interagir diretamente com heme (Galbraith 1990); (Worthington, Cohn et al. 2001); (Tang, Xu et al. 2003); (Quigley, Yang et al. 2004); (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005). O heme liga ao canal Slo1 e inibe as correntes

transmembrana de K⁺ diminuindo a frequência de abertura do canal. Esse efeito ocorreu somente quando o heme foi aplicado no lado intracelular da membrana (Tang, Xu et al. 2003). Similarmente, o receptor de superfície para o vírus da leucemia felina é um exportador de heme intracelular, afetando a eritropoiese (Quigley, Yang et al. 2004), enquanto uma proteína importadora de heme foi recentemente identificada em células epiteliais intestinais (Shayeghi, Latunde-Dada et al. 2005). Nós também demonstramos que o heme induz a secreção de TNF- α por macrófagos e células dendríticas de maneira dependente de TLR-4, CD14 e da molécula adaptadora MyD88 (Figueiredo, Fernández et al. 2007). Esses trabalhos claramente demonstram que o heme requer receptores de membrana específicos para induzir ou afetar vias de sinalização intracelular e várias funções nas células.

Os efeitos agonísticos e antagonísticos do heme e de moléculas análogas, junto com o efeito inibitório da toxina pertussis (Fig. 12A), suportam o conceito de uma interação física do anel porfirínico com um GPCR. A protoporfirina IX, que não tem o átomo de ferro ligado ao anel porfirínico, assim como as outras porfirinas com substituições nos metais ligados ao anel, foram capazes de induzir a migração de neutrófilos (Fig. 8A e B). Estudos prévios mostraram que a protoporfirina IX e outras porfirinas foram incapazes de afetar a corrente de K⁺ no canal Slo1 ou a secreção de TNF- α por macrófagos (Tang, Xu et al. 2003); (Figueiredo, Fernández et al. 2007). Nessas situações, provavelmente o átomo de ferro está envolvido na interação do heme com o canal Slo1 e com o receptor TLR-4. Esses resultados sugerem que um provável GPCR envolvido no reconhecimento de porfirinas por neutrófilos seria mais promíscuo nas suas propriedades ativadoras do que o canal Slo1 e o TLR-4.

A mesoporfirina IX teve um efeito antagonístico dose-dependente sobre a migração de neutrófilos induzida por heme *in vitro*, sugerindo que esse análogo compete pelo mesmo sítio de ligação ao heme num provável GPCR. Esse efeito da mesoporfirina IX parece ser seletivo para o heme, uma vez que ela não inibiu a migração dos neutrófilos induzida por um agente quimiotático clássico, o PAF (Fig. 9A e B). Além disso, a mesoporfirina IX inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por heme

ou sangue, mas não o recrutamento induzido por LPS ou tioglicolato (Fig. 10A e B), suportando mais uma vez a noção de que a mesoporfirina IX atua como um antagonista seletivo do heme. As propriedades anti-inflamatórias da mesoporfirina já foram demonstradas anteriormente. A mesoporfirina inibiu a produção de IL-6 induzida por IL-1 β em células MG-63 *in vitro*, mas não foi capaz de inibir a produção de TNF- α induzida por LPS em células RAW 264.7 (Takaoka, Matsuura et al. 1999). Além disso, a Sn-mesoporfirina IX conferiu proteção contra os efeitos deletérios da hemorragia cerebral induzida por uma injeção intracerebral de sangue em coelhos (Koeppen, Dickson et al. 2004).

O efeito do sangue sobre o recrutamento de neutrófilos muito provavelmente foi mediado pelo heme. Vários estudos têm mostrado que a hemoglobina pode atuar como uma molécula pró-inflamatória. A hemoglobina é uma proteína ligadora de LPS, que aumenta sinergicamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS. Animais que recebem uma infusão i.v. de hemoglobina antes ou coincidente com uma injeção i.p. de LPS apresentam mortalidade acentuada (Su, Roth et al. 1999). A injeção de hemoglobina em ratos aumenta a toxicidade letal da peritonite causada por *E. coli*, diminuindo a viabilidade dos fagócitos e aumentando o crescimento da bactéria (Yoo, Kim et al. 1999). Por outro lado, a globina purificada da hemoglobina humana apresenta um efeito oposto ao da hemoglobina, ou seja, a globina inibe completamente a liberação de TNF induzida por LPS em macrófagos (Yang, Wang et al. 2002). Em adição, a globina neutraliza as ações biológicas do LPS *in vivo*, conferindo proteção contra a letalidade do CLP (perfuração e ligação cecal), um modelo de infecção intra-abdominal (Yang, Wang et al. 2002). Esses dados indicam que o heme presente na hemoglobina aumenta a resposta inflamatória ao LPS, enquanto a globina inibe. O conjunto desses resultados sugere que a migração de neutrófilos induzida por episódios hemorrágicos ocorre através da ativação de um receptor quimiotático por heme.

O efeito do heme sobre o recrutamento de leucócitos mostrou-se seletivo para neutrófilos, uma vez que não induziu o recrutamento de células mononucleares para a cavidade peritoneal dos animais, de 90 minutos até 48

horas (Fig. 7B). Esse resultado é corroborado por um estudo prévio que mostra que a injeção intratorácica de heme em ratos induziu uma reação inflamatória intensa, caracterizada pela formação de edema e acúmulo de neutrófilos nas cavidades pleurais dos animais (Graça-Souza, Arruda et al. 2002).

As respostas imunes e inflamatórias podem ser disparadas na ausência de agentes microbianos. Os receptores da família Toll desempenham um papel central no disparo da resposta imune inata e muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de identificar ligantes endógenos que poderiam ativar o sistema imune inato através destes receptores (Beg 2002). Nós mostramos que o heme é capaz de induzir a secreção de TNF- α por macrófagos de maneira dependente da ativação do receptor TLR-4 (Figueiredo, Fernández et al. 2007). Por outro lado, a indução do recrutamento de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos ocorre de maneira independente de TLR-4 (Fig. 11 e Figueiredo, Fernández et al. 2007). Então, o heme ativa células do sistema imune inato dependente e independentemente de TLR-4. Além disso, moléculas análogas ao heme, como a protoporfirina IX e a mesoporfirina IX, não são capazes de induzir a secreção de TNF- α pelos macrófagos (Figueiredo, Fernández et al. 2007). Assim, o mecanismo de ativação de macrófagos pelo heme é similar, mas não igual, ao mecanismo de ativação de neutrófilos por heme. Isso porque a ativação do receptor TLR-4 requer a presença do átomo de ferro e dos grupos vinil na estrutura do heme, mas a ativação de um possível receptor quimiotático não necessita do átomo de ferro, porém, a presença dos grupos vinil é fundamental para a indução da migração de neutrófilos pelo heme.

As mesoporfirinas são análogos do heme que apresentam uma diferença estrutural com relação ao anel porfirínico. As mesoporfirinas não têm os dois grupos vinil nos seus anéis; no lugar deles, elas apresentam dois grupos etila. Sabe-se que os grupos vinil são importantes para a associação do heme com as hemoproteínas, incluindo o citocromo c. O heme encontra-se covalentemente ligado ao citocromo c através de pontes tioéster formadas pelos grupos vinil do heme com resíduos de cisteína na proteína (Daltrop, Allen et al. 2002). A ligação entre os grupos vinil do heme e os resíduos de cisteína no citocromo c

é quimicamente complexa e pouco entendida, porém foi mostrado que a substituição das cisteínas por alaninas resulta na formação de citocromo b, onde o heme não está covalentemente ligado e pode ser removido mais facilmente (Tomlinson and Ferguson 2000). Além disso, os grupos vinil são altamente hidrofóbicos, facilitando assim a interação do anel porfirínico com regiões específicas em proteínas ou nas membranas celulares. O motivo de ligação do heme ao citocromo c é o mais estudado entre as proteínas que apresentam heme como grupamento prostético, sendo constituído pela sequência de aminoácidos CXXCH (onde X é um aminoácido qualquer). A análise de sequência do canal Slo1 revelou a presença do motivo CXXCH e os autores mostraram que o heme modifica o canal de maneira dependente das cisteínas presentes na sequência. Com base nesses dados e no resultado que mostra a inibição da migração dos neutrófilos pela toxina pertussis (Fig. 12A), nós analisamos as sequências de aminoácidos presentes nos receptores quimiotáticos para neutrófilos, com o objetivo de encontrar um possível receptor para o heme. De fato, nós encontramos a sequência CXXCH, conhecida como motivo ligador de heme (que está presente no citocromo c e no canal Slo1) em dois receptores quimiotáticos para neutrófilos: os receptores para o LTB₄, BLT1 e BLT2. No BLT1, o motivo CXXCH está localizado na borda externa do terceiro segmento transmembrana, enquanto no BLT2 fica localizado na borda externa do quinto segmento transmembrana (Fig. 16).

O receptor BLT1 é o receptor de alta afinidade para o LTB₄ e é expresso principalmente em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, mas baço, timo, medula óssea e linfonodos também expressam BLT1. A expressão do BLT2 está presente na maioria dos tecidos humanos, com a expressão sendo mais alta no baço, fígado, ovário e leucócitos do sangue periférico, mas o BLT2 tem baixa afinidade pelo seu ligante. A ativação desses receptores induz quimiotaxia, quimiocinese, influxo de cálcio e produção de espécies reativas de oxigênio em leucócitos. Através da indução do recrutamento e ativação de leucócitos e por prevenir a apoptose dessas células, o LTB₄ e seus receptores também participam na patogênese de muitas doenças inflamatórias (Tager and Luster 2003); (Okuno, Yokomizo et al. 2005). Assim, o heme poderia ligar aos

receptores BLT1 e BLT2 para induzir a quimiotaxia dos neutrófilos. Para confirmar essa hipótese, nós pré-tratamos os neutrófilos com antagonistas dos receptores BLT1 e BLT2 para avaliar se o heme induziria a migração dessas células pela ativação de um desses receptores ou dos dois. O pré-tratamento dos neutrófilos com CP105,696, antagonista do BLT1, inibiu apenas parcialmente a migração dos neutrófilos induzida por heme, mas o U-75302, outro antagonista do BLT1 e o LY255283, antagonista do BLT2, aboliram a migração induzida por heme (Fig. 17A). Esse efeito parcial demonstrado pelo CP105,696 parece estranho, porque ele é um antagonista muito potente do receptor BLT1. Como era esperado, o pré-tratamento dos neutrófilos com os antagonistas aboliu a quimiotaxia induzida por LTB₄ (Fig. 17B). Então parece que o heme ativa os receptores BLT1 e BLT2 para estimular a quimiotaxia de neutrófilos. Por outro lado, experimentos feitos pelo Dr. Marcelo Bozza no laboratório do Dr. Bodduluri Haribabu, nos Estados Unidos, com células 300.19 transfectadas com os receptores BLT1 e BLT2, mostraram que o heme não foi capaz de induzir a quimiotaxia dessas células (dados não mostrados). A célula 300.19 é uma linhagem celular murina pré-B, que não apresenta expressão endógena detectável dos receptores responsivos ao LTB₄ e foi previamente utilizada para estudar as vias de transdução de sinal ativadas por moléculas de adesão de leucócitos e receptores de quimiocina. O fato do heme não induzir a quimiotaxia das células 300.19 transfectadas com os receptores BLT1 e BLT2 pode significar que o heme necessita da expressão de um co-receptor ou uma molécula adaptadora para induzir a migração dessas células. As células 300.19 e os neutrófilos são de origens diferentes e pode ser que esteja faltando alguma molécula específica na maquinaria da célula 300.19 que capacita a migração induzida pelo heme. De fato, estudos mais aprofundados são necessários para que nós possamos afirmar com certeza que o heme liga e interage fisicamente com os receptores BLT1 e BLT2.

A estimulação da quimiotaxia por uma quimiocina ou quimioatraente requer o acoplamento funcional do receptor à proteína G α i, uma vez que a migração é completamente inibida pelo tratamento das células com toxina pertussis (Thelen 2004). Entretanto, a proteína G α i parece não ser necessária para a migração celular. O passo essencial é a liberação das subunidades $\beta\gamma$ da

proteína $G\alpha_i$ e do receptor acoplado à proteína G (Neptune, Iri et al. 1999). As subunidades $\beta\gamma$ liberadas dos receptores acoplados à proteína G_i , mas não aquelas liberadas dos receptores acoplados às proteínas G_q ou G_s , medeiam a migração celular. A importância do acoplamento à proteína G_i foi demonstrada em receptores que, em condições fisiológicas, não induzem quimiotaxia. Os receptores opióides estimulam a quimiotaxia via proteína G_i quando são expressos em células capazes de migrar. Por outro lado, os receptores acoplados à proteína G_s ou G_q não estimulam a quimiotaxia, mesmo quando são expressos em células capazes de migrar (Neptune and Bourne 1997). A liberação das subunidades $\beta\gamma$ é requerida, mas não suficiente para a indução da quimiotaxia. Em adição à ativação da proteína G, os receptores com sete domínios transmembrana geram sinais acessórios que induzem respostas funcionais (Thelen 2004), através da ativação de moléculas efetoras que estão abaixo da proteína G na cascata de sinalização. Graça-Souza e colaboradores (2002) mostraram que a migração de neutrófilos induzida por heme requer a atividade da PKC. Nós estendemos esta observação, mostrando que além do requerimento da proteína $G\alpha_i$, o heme também ativa PI3K, PLC- β , RhoK, ERK e p38 para induzir a migração de neutrófilos (Fig. 12). Essas vias de sinalização foram avaliadas porque se sabe que elas fazem parte da cascata de sinalização que é ativada por receptores quimiotáticos (Neves, Ram et al. 2002). De fato, vários quimioatraentes de neutrófilos ativam proteína $G\alpha_i$, PI3K e MAPKs para estimular a migração dessas células (Heit, Tavener et al. 2002); (Coxon, Rane et al. 2003). Duas isoformas de PI3K parecem ser essenciais para a migração de neutrófilos induzida por vários quimioatraentes. Neutrófilos de camundongos deficientes de PI3K γ demonstram uma profunda redução na quimiotaxia induzida por IL-8, fMLP e C5a (Hirsch, Katanaev et al. 2000). Além disso, PI3K δ é requerida para a migração direcional de neutrófilos, uma vez que o tratamento das células com um inibidor específico dessa isoforma inibe a quimiotaxia induzida por fMLP, mas não a migração randômica dos neutrófilos (Sadhu, Masinovsky et al. 2003). Os nossos dados mostram que o tratamento dos neutrófilos com LY294002, um inibidor de PI3K amplamente utilizado, abole a quimiotaxia induzida por heme (Fig. 12B). Esse inibidor não distingue as isoformas de PI3K,

mas demonstra de forma robusta que a ativação de PI3K é fundamental para o efeito do heme na migração de neutrófilos.

As duas isoformas de PLC que estão envolvidas na transdução de sinal induzida por quimiocinas são ativadas pela interação direta com as subunidades $\beta\gamma$, as quais são liberadas do GPCR. Em neutrófilos de camundongos que não têm os genes que codificam a PLC- β 2 e a PLC- β 3, a elevação de cálcio induzida por quimiocina é completamente suprimida, o que suporta a conclusão de que PLC- β 2 e PLC- β 3 são as únicas isoformas de PLC que são ativadas por quimiocinas em neutrófilos. A ativação de PLC resulta na produção de inositol trifosfato (IP₃) e formação de diacilglicerol (DAG), e a subsequente ativação de PKC (Thelen 2004). Os nossos resultados mostram que o pré-tratamento dos neutrófilos humanos com o inibidor de PLC- β , U-73122, aboliu a quimiotaxia induzida por heme (Fig. 12C). Esse inibidor se mostrou específico para a isoforma PLC- β 2 e também inibiu a migração de neutrófilos induzida por IL-8 e LTB₄ (Hou, Kirchner et al. 2003). Então, o heme parece ativar a isoforma PLC- β 2, uma das duas isoformas ativadas por quimiocinas, para induzir a migração de neutrófilos.

As GTPases monoméricas da família Rho desempenham um importante papel na regulação da dinâmica do citoesqueleto e mobilidade celular em resposta a estímulos externos (Ridley 2001). Rho quinase (proteína quinase associada a Rho), uma das proteínas-alvo de Rho, é implicada em muitos processos que estão abaixo de Rho na cascata de sinalização, como a migração transendotelial de monócitos (Honing, van den Berg et al. 2004). Além disso, Rho quinase (RhoK) parece estar envolvida na quimiotaxia de monócitos induzida por ATL-1, um análogo da lipoxina A₄ (Simões and Fierro 2005). Assim, nós hipotetizamos que, além de desempenhar um papel na migração de monócitos, RhoK poderia também estar envolvida na migração de neutrófilos. De fato, quando nós pré-incubamos os neutrófilos com o inibidor de RhoK, Y-27632, a migração induzida por heme foi parcialmente inibida (Fig. 12D). Então, a quimiotaxia de neutrófilos induzida por heme depende em parte da ativação de RhoK. Outra GTPase monomérica poderia também estar envolvida nesse efeito do heme sobre os neutrófilos, o que explicaria o efeito inibitório parcial do Y-27632.

Por outro lado, a participação de ERK na quimiotaxia de neutrófilos parece ser controversa. Coffey e colaboradores (1998) mostraram que o pré-tratamento de neutrófilos com um inibidor de ERK não inibiu a migração dessas células induzida por PAF ou fMLP. Em contradição a esse estudo, Coxon e colegas (2003) demonstraram que a inibição da ativação de ERK bloqueia parcialmente a migração de neutrófilos induzida por fMLP e que o pré-tratamento simultâneo com inibidores de ERK e p38 tem um efeito aditivo no bloqueio da quimiotaxia. Os nossos resultados mostram que o pré-tratamento dos neutrófilos com o inibidor de ERK (PD98059) inibe completamente a migração induzida por heme, assim como o tratamento com o inibidor de p38 (SB203580) (Fig. 12E). Assim, parece que pelo menos para a quimiotaxia de neutrófilos induzida pelo heme, a ativação das MAP quinases ERK e p38 tem um papel essencial.

Os nossos resultados indicam que o heme atua como uma molécula quimiotática para neutrófilos, ativando proteína G α i e induzindo vias de sinalização que são características de quimioatraentes. Um estudo prévio mostrou que o heme protege os neutrófilos da apoptose de maneira dependente das vias de PI3K e MAP quinases (Arruda, Rossi et al. 2004), sugerindo que vias de sinalização similares estão envolvidas na sobrevivência e na migração de neutrófilos induzidas por heme.

Os neutrófilos são células especializadas na geração de espécies reativas de oxigênio, conhecida como “burst” oxidativo. Além de ser uma função característica dos neutrófilos, a ativação do “burst” oxidativo é um parâmetro para se avaliar a ativação dessas células em resposta a estímulos externos. As ROS, como superóxido e peróxido de hidrogênio, são tidas como produtos tóxicos do metabolismo celular, que danificam inespecificamente ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e outros componentes celulares. Entretanto, evidências crescentes têm mostrado que as ROS, em concentrações moderadas, atuam como moléculas sinalizadoras e desempenham um importante papel na regulação de várias funções celulares. Por outro lado, a produção excessiva ou sustentada de ROS tem sido implicada na patogênese de várias doenças, como aterosclerose e hipertensão (Zhang and Gutterman 2006). O heme é um potente gerador de radicais livres, pois o

átomo de ferro presente na molécula de heme gera ROS através das reações de Fenton e Haber-Weiss (Quaye 2008). Nós mostramos que o heme induz a quimiotaxia de neutrófilos através da ativação de vias de sinalização típicas de moléculas quimiotáticas; então resolvemos avaliar se o heme ativaria as mesmas vias de sinalização para a indução de ROS por neutrófilos. De fato, a geração de ROS induzida por heme requer a ativação de proteína $G\alpha i$ e PI3K. Esse efeito foi parcialmente dependente de PLC- $\beta 2$, PKC, RhoK e p38, mas independente de ERK (Fig. 13). Estudos prévios utilizando inibidores farmacológicos implicaram as vias de PI3K e PLC-PKC na regulação da produção de superóxido induzida por quimiocinas (Coffer, Geijsen et al. 1998); (Wu, Huang et al. 2000). Esses resultados foram confirmados por estudos com camundongos deficientes dessas moléculas. Neutrófilos de camundongos deficientes de PI3K γ são menos responsivos à geração de ROS induzida por agentes quimiotáticos, como fMLP (Hirsch, Katanaev, et al. 2000). A ativação de PKC é estimulada por quase todos os receptores de superfície e não é um evento característico da transdução de sinal induzida por quimiocinas. Entretanto, a ativação de PKC por quimiocinas é requerida para certas respostas, por exemplo, o “burst” oxidativo de neutrófilos (Thelen 2004). A ativação de PKC pelo heme poderia ser um evento consequente da liberação da subunidade $\beta\gamma$ de uma proteína $G\alpha i$ ativada. O nosso resultado com o inibidor de PLC- $\beta 2$ suporta esse conceito. Uma segunda possibilidade é que a PKC seja ativada como consequência da geração de ROS. Já foi demonstrado que o ânion superóxido e o periodato podem ativar PKC diretamente (Gopalakrishna and Anderson 1991); (Gopalakrishna, Gundimeda et al. 2008). Além disso, as ROS, como o peróxido de hidrogênio, ativam diretamente as proteínas $G\alpha i$ e $G\alpha 0$ sem ativação de um receptor (Nishida, Maruyama et al. 2000). A ativação de $G\alpha i$ induzida por ROS leva à liberação de $G\beta\gamma$, causando possivelmente a ativação de vias de sinalização abaixo de $G\beta\gamma$. A subunidade $\beta\gamma$ liberada de $G\alpha i$ pelo estresse oxidativo ativa PI3K, que leva à ativação de AKT e ERK (Nishida, Maruyama et al. 2000). Então, nós podemos hipotetizar que o heme ativa a proteína $G\alpha i$ nos neutrófilos, induzindo a migração e a geração de ROS, que, por sua vez, ativam as células adjacentes

através de G α i e/ou PKC, levando a uma amplificação da resposta inflamatória.

Uma variedade de sistemas enzimáticos são potenciais fontes de ROS, incluindo NADPH oxidase, Xantina oxidase, citocromo P450 e a cadeia respiratória mitocondrial, entre outros (Zhang and Gutterman 2006). Além disso, o heme induz a produção de superóxido por neutrófilos humanos através da ativação da NADPH oxidase (Graça-Souza, Arruda et al. 2002). Nós então resolvemos investigar se o heme seria capaz de induzir a produção de ROS através de outros sistemas geradores de ROS, além da NADPH oxidase. O antioxidante não-seletivo NAC aboliu a produção de ROS induzida por heme, assim como o inibidor de flavoenzimas, DPI (Fig. 13B e E). Então, parece que a geração de ROS por heme requer a atividade da NADPH oxidase, confirmando os dados de Graça-Souza e colaboradores.

A mitocôndria é sensível ao estresse oxidativo e a produção de ROS por essa via poderia ocorrer como consequência da produção de superóxido pela NADPH oxidase. Como o DPI inibe a ativação das flavoenzimas, ele poderia estar inibindo também a produção de ROS pela mitocôndria. Por outro lado, a inibição do complexo I mitocondrial pela Rotenona não inibiu a geração de ROS, nem a utilização do desacoplador da mitocôndria, FCCP (Fig. 13C e G). Logo, parece que a mitocôndria não desempenha nenhum papel na produção de ROS induzida por heme. A inibição da xantina oxidase pelo Alopurinol também não interferiu na produção de ROS induzida pelo heme (Fig. 13D). Portanto, a geração de ROS estimulada por heme em neutrófilos ocorre pela ativação da NADPH oxidase. De fato, esta enzima é uma das principais fontes de ROS em fagócitos, incluindo neutrófilos. Os quimioatraentes de neutrófilos, como IL-8 e fMLP, também induzem a geração de superóxido por essas células através da ativação da NADPH oxidase (Fu, Bylund et al. 2004).

As espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas em diversas vias de sinalização que controlam funções celulares específicas. Arruda e colaboradores propuseram um mecanismo para o controle da apoptose de neutrófilos por heme, no qual o heme promoveria a manutenção do potencial transmembrana mitocondrial, induzindo a sobrevivência dessas células. Esse fenômeno é controlado pelas ROS derivadas da NADPH oxidase, via ativação

do fator de transcrição NF- κ B (Arruda, Barcellos-de-Souza et al., 2006). Nós então hipotetizamos que o heme poderia induzir a migração de neutrófilos por um mecanismo similar, ou seja, a migração dessas células seria dependente da geração de ROS pela NADPH oxidase. Nós observamos que a inibição da xantina oxidase e do complexo I mitocondrial pelo Alopurinol e pela Rotenona, respectivamente, não afetou a migração induzida por heme (Fig. 15C e B), indicando que esses sistemas não estão envolvidos na quimiotaxia de neutrófilos estimulada por heme. Por outro lado, a inibição da NADPH oxidase pelo DPI e pela Apocinina inibiu apenas parcialmente a migração dos neutrófilos (Fig. 15D), o que sugere que outros sistemas geradores de ROS estão envolvidos na migração dos neutrófilos induzida por heme. Mas quando as células foram pré-tratadas com o antioxidante não-seletivo NAC, também observamos uma inibição parcial da quimiotaxia (Fig. 15A). Desse modo, parece que a migração de neutrófilos induzida por heme requer a geração de ROS pela NADPH oxidase, mas também outras moléculas sinalizadoras, suportando a noção de que as vias de sinalização ativadas por receptores quimiotáticos são necessárias para esse efeito do heme.

Com base na análise de sequência dos receptores BLT1 e BLT2, onde podemos observar a presença do motivo ligador de heme (sequência CXXCH) e nos resultados que mostram que a quimiotaxia dos neutrófilos por heme é dependente da ativação desses receptores, nós resolvemos avaliar se a geração de ROS induzida por heme em neutrófilos também dependeria dos receptores BLT1 e BLT2. De fato, quando os neutrófilos são pré-tratados com os antagonistas de BLT1 e BLT2, a produção de ROS estimulada por heme é abolida (Fig. 18), o que sugere que o heme ativa esses receptores para induzir ROS em neutrófilos humanos. A ativação de BLT1 e BLT2 pelo seu agonista, LTB₄, induz a geração de ROS em neutrófilos (Tager and Luster 2003).

Graça-Souza e colaboradores (2002) mostraram que o heme induz a expressão do mRNA de IL-8 em neutrófilos humanos estimulados *in vitro*. Tendo em vista que o heme não foi capaz de induzir a migração de células 300.19 transfectadas com os receptores BLT1 e BLT2, nós hipotetizamos que a migração de neutrófilos pode ser favorecida pela indução de moléculas quimiotáticas pelo próprio heme. Então, neutrófilos humanos foram pré-

tratados com zileuton, um inibidor da ativação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO), a qual é responsável pela formação de LTB₄ e cisteinil leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄). O pré-tratamento com zileuton inibiu parcialmente a migração de neutrófilos estimulada por heme (Fig. 19A), o que sugere que o heme induz a secreção de metabólitos da enzima 5-LO para favorecer a quimiotaxia dessas células. Muito provavelmente o metabólito da 5-LO envolvido na migração dos neutrófilos por heme é o LTB₄, uma vez que ele é um quimioatraente muito potente de neutrófilos e os cisteinil leucotrienos não são quimiotáticos para essas células. Por outro lado, o pré-tratamento com zileuton não foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida por LTB₄ (Fig. 19B). Apesar da inibição da produção de LTB₄ pelos neutrófilos, a quimiotaxia ocorreu porque o próprio quimioatraente estava presente como estímulo na placa de quimiotaxia. A migração dos neutrófilos ainda observada em direção ao heme pode ter ocorrido como resultado da ativação de um receptor quimiotático pelo heme, por exemplo BLT1 e/ou BLT2, uma vez que a utilização dos antagonistas desses receptores aboliram a quimiotaxia induzida por heme (Fig. 17A). Então, parece estar acontecendo dois fenômenos simultâneos durante a migração de neutrófilos induzida por heme: os neutrófilos migram de forma randômica em direção ao heme na placa de quimiotaxia e são ativados pelo heme, secretando LTB₄, que, por sua vez, induz a migração dessas células; e o heme induz diretamente a migração dos neutrófilos pela ativação de BLT1 e/ou BLT2 na superfície das células.

O LTB₄ induz a migração transepitelial de neutrófilos e esse efeito é mediado pela ativação do receptor BLT1 e dependente de ERK e de ROS geradas pela ativação da NADPH oxidase (Woo, Yoo et al. 2003). Para que ocorra a transmigração de leucócitos, é necessário que haja um aumento na permeabilidade vascular. Tendo em vista que o heme induz o recrutamento de neutrófilos *in vivo*, nós hipotetizamos que heme também induziria um aumento na permeabilidade vascular. De fato, quando aplicado no “cheek pouch” de hamster, o heme induziu um aumento na permeabilidade vascular, observado pelo extravasamento de plasma dos capilares (Fig. 20). Esse efeito do heme sobre a permeabilidade vascular pode ser fundamental para a indução do recrutamento de neutrófilos *in vivo*. Desse modo, parece que o

heme apresenta todas as características de moléculas quimiotáticas: induz a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*, estimula a geração de ROS e esses efeitos são dependentes de vias de sinalização típicas de quimioatraentes e da ativação de receptores quimiotáticos (BLT1 e BLT2). Além disso, o heme induz um aumento na permeabilidade vascular, que também é efeito típico de moléculas quimiotáticas.

Um estudo prévio mostrou que a neuroglobina humana, uma hemoproteína, é capaz de ligar diretamente à subunidade α da proteína $G\alpha i$ *in vitro*. A interação da neuroglobina com $G\alpha i$ libera a subunidade $\beta\gamma$, levando à ativação de vias de sinalização dependentes de $G\beta\gamma$ (Wakasugi, Nakano et al. 2003). Entretanto, os nossos resultados mostrando que os antagonistas dos receptores BLT inibem profundamente a quimiotaxia de neutrófilos induzida por heme demonstram claramente que esse efeito do heme requer a ativação de um GPCR. Estudos mais aprofundados são necessários para demonstrar a interação física entre o heme e os receptores BLT1 e BLT2.

Durante um episódio hemolítico, a hemoglobina livre vascular é associada à haptoglobina, que, por sua vez, liga ao seu receptor, CD163, nos hepatócitos, promovendo a endocitose do complexo e posterior degradação do heme pela HO-1 (Kristiansen, Graversen et al. 2001). Entretanto, a hemoglobina pode ser convertida em metemoglobina, que libera o heme. A natureza pró-oxidante e pró-inflamatória do heme requer um sistema eficiente de transporte e degradação, para evitar os efeitos deletérios dessa molécula. Muitas espécies produzem proteínas plasmáticas ligadoras de heme, como hemopexina ou albumina, que ligam e removem o heme livre intravascular (Wagener, Folk et al. 2003). Por outro lado, quando grandes quantidades de heme livre se acumulam, as proteínas ligadoras de heme são saturadas e são incapazes de ligar a todas as moléculas de heme. Neste trabalho, nós utilizamos concentrações de heme, tanto *in vitro* como *in vivo*, compatíveis com as concentrações observadas durante episódios hemorrágicos e hemolíticos, indicando que o mecanismo de recrutamento e ativação de neutrófilos descrito aqui pode ser clinicamente relevante. Curiosamente, um estudo recente indicou que o heme está criticamente envolvido na patogênese da malária cerebral, afetando a integridade da barreira hematoencefálica e

causando neuroinflamação (Pamplona, Ferreira et al. 2007). Considerando o papel dos neutrófilos na patogênese da malária cerebral (Chen, Zhang et al. 2000), nós especulamos que o mecanismo pelo qual o heme potencializa a neuroinflamação envolve a ativação da proteína G α i nesses leucócitos. De fato, os mecanismos moleculares da inflamação induzida por heme durante a malária necessitam maiores investigações.

Os nossos resultados sugerem que o heme liberado em situações de hemorragia ou hemólise atua como um quimioatraente, estimulando a migração de neutrófilos e a geração de espécies reativas de oxigênio através de proteína G α i e vias de sinalização específicas, amplificando a resposta inflamatória. Por outro lado, os nossos resultados *in vitro* e os resultados *in vivo* obtidos no laboratório do Dr. Cláudio Canetti mostram que a migração de neutrófilos depende em parte da secreção de LTB₄ induzida pelo heme. Além disso, o heme induz outros efeitos nas células do sistema imune inato, por exemplo a produção de TNF- α por macrófagos de maneira dependente de TLR-4, CD14 e MyD88 e a produção de IL-1 β dependente de ASC e Caspase-1, proteínas que fazem parte do complexo inflamassomo. A caracterização das mesoporfirinas como antagonistas seletivos do heme permitirá definir o papel do heme endógeno em condições inflamatórias disparadas por hemólise intra e extravascular ou dano celular extenso, como na anemia falciforme, isquemia-reperfusão, malária, febres hemorrágicas e leptospirose. Em adição, as mesoporfirinas e os antagonistas de BLT e IL-1 β podem ser úteis no tratamento dos processos inflamatórios desencadeados por doenças hemolíticas ou hemorrágicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aghajanian, A., E. S. Wittchen, et al. (2008). "Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration." J Thromb Haemost **6**: 1453-1460.

Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nature Rev Immunol **4**: 499-511.

Akira, S. (2006). "TLR signaling." Curr Top Microbiol Immunol **311**: 1-16.

Ali, H., B. Haribabu, et al. (1997). "Mechanisms of inflammation and leukocyte activation." Med Clin North Am **81**(1): 1-28.

Allen, S. J., S. E. Crown, et al. (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." Annu Rev Immunol **25**: 787-820.

Arruda, M., A. Rossi, et al. (2004). "Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF- κ B." J Immunol **173**: 2023-2030.

Arruda, M., P. Barcellos-de-Souza, et al. (2006). "NADPH oxidase-derived ROS: key modulators of heme-induced mitochondrial stability in human neutrophils." Exp Cell Res **312**: 3939-3948.

Au, B., M. Teixeira, et al. (2001). "Blockade of PAF receptors controls IL-8 production by regulating the activation of neutrophil CD11/CD18." Eur J Pharmacol **425**: 65-71.

Balla, G., H. S. Jacob, et al. (1991). "Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury." Arterioscler Thromb **11**(6): 1700-1711.

Barnes, P., K. Chung, et al. (1998). "Inflammatory mediators of asthma: an update." Pharmacol Rev **50**(4): 515-596.

Beg, A. A. (2002). "Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses." TRENDS Immunol **23**: 509-512.

Bishop, A. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348**: 241-255.

Bogdan, C. (2004). "Reactive oxygen and reactive nitrogen metabolites as effector molecules against infectious pathogens." In: The innate immune response to infection. Eds.: Kaufmann, S. H. E., Medzhitov, R., Gordon, S. pp. 357-396.

Bokoch, G. M. and U. G. Knaus (2003). "NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!" TRENDS Biochem Sci **28**(9): 502-508.

Brink, C., S.-E. Dahlen, et al. (2003). "International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors." Pharmacol Rev **55**(1): 195-227.

Carstanjen, D., A. Yamauchi, et al. (2005). "Rac2 regulates neutrophil chemotaxis, superoxide production, and myeloid colony formation through multiple distinct effector pathways." J Immunol **174**(8): 4613-4620.

Chapman, J., L. Otterbein, et al. (2001). "Carbon monoxide attenuates aeroallergen-induced inflammation in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**: L209-L216.

Chen, L., Z.-H. Zhang, et al. (2000). "Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria." Clin Exp Immunol **120**:125-133.

Chen, Q., D. W. Powell, et al. (2003). "AKT phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils." J Immunol **170**(10): 5302-5308.

Cicchetti, G., P. Allen, et al. (2002). "Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly." Crit Rev Oral Biol Med **13**(3): 220-228.

Clark, J., R. Foresti, et al. (2000). "Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress." Biochem J **348**: 615-619.

Coffer, P. J., N. Geijsen, et al. (1998). "Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function." Biochem J **329**: 121-130.

Condliffe, A. M., L. M. Webb, et al. (2006). "RhoG regulates the neutrophil NADPH oxidase." J Immunol **176**(9): 5314-5320.

Coxon, P. Y., M. J. Rane, et al. (2003). "MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils." Cell Signalling **15**: 993-1001.

Dale, D. C., L. Boxer, et al. (2008). "The phagocytes: neutrophils and monocytes." Blood **112**: 935-945.

Dalpiaz, A., S. Spisani, et al. (2003). "Studies on human neutrophil biological functions by means of formyl-peptide receptor agonists and antagonists." Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord **3**(1): 33-42.

- Daltrop, O., J. Allen, et al. (2002). "In vitro formation of a c-type cytochrome." Proc Natl Acad Sci USA **99**(12): 7872-7876.
- Dawson, J. H. (1988). Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases." Science **240**(4851): 433-439.
- Delanghe, J. and M. Langlois (2001). "Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine." Clin Chim Acta **312**: 13-23.
- Diebold, B. A., B. Fowler, et al. (2004). "Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species." J Biol Chem **279**(27): 28136-28142.
- Dore, S., M. Takahashi, et al. (1999). "Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury." Proc Natl Acad Sci USA **96**: 2445-2450.
- Edens, H. and C. Parkos (2003). "Neutrophil transendothelial migration and alteration in vascular permeability: focus on neutrophil-derived azurocidin." Curr Opin Hematol **10**(1): 25-30.
- Ellson, C. D., K. Davidson, et al. (2006). "Neutrophils from p40^{phox}^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing." J. Exp. Med. **203**(8): 1927-1937.
- Ferreira, A., J. Balla, et al. (2008). "A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?" J Mol Med **86**(10): 1097-10111.
- Figueiredo, R. T., P. L. Fernández, et al. (2007). "Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4." J Biol Chem **282**(28): 20221-20229.
- Fondevila, C., R. Busutil, et al. (2003). "Hepatic ischemia/reperfusion injury - a fresh look." Exp Mol Pathol **74**: 86-93.
- Fu, H., J. Bylund, et al. (2004). "The mechanism for activation of the neutrophil NADPH-oxidase by the peptides formyl-Met-Leu-Phe and Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met differs from that for interleukin-8." Immunology **112**: 201-210.
- Galbraith, R. A. (1990). "Heme binding to HepG2 human hepatoma cells." J Hepatol **10**(3): 305-310.
- Galbraith, R. A., S. Sassa, et al. (1985). "Heme binding to murine erythroleukemia cells. Evidence for a heme receptor." J Biol Chem **260**(22): 12198-12202.
- Gavard, J. and J. S. Gutkind (2008). "Protein kinase C-related kinase and ROCK are required for thrombin-induced endothelial cell permeability downstream from Gα12/13 and Gα11/q." J Biol Chem **283**(44): 29888-29896.

- Gonçalves, G. M., M. A. Cenedeze, et al. (2006). "The role of heme oxygenase 1 in rapamycin-induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury." Kidney Int **70**(10): 1742-1749.
- Gopalakrishna, R. and W. B. Anderson (1991). "Reversible oxidative activation and inactivation of protein kinase C by the mitogen/tumor promoter periodate." Arch Biochem Biophys **285**(2): 382-387.
- Gopalakrishna, R., Gundimeda, U., et al., (2008). "A direct redox regulation of protein kinase C isoenzymes mediates oxidant-induced neuritogenesis in PC12 cells." J Biol Chem **283**(21): 14430-14444.
- Graça-Souza, A., M. Arruda, et al. (2002). "Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes." Blood **99**: 4160-4165.
- Heit, B., S. Tavener, et al. (2002). "An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients." J Cell Biol **159**(1): 91-102.
- Hirsch, E., V. L. Katanaev, et al. (2000). "Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation." Science **287**: 1049-1053.
- Hisama, N., Y. Yamaguchi, et al. (1996). "Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury in rats." Hepatology **24**(5): 1193-8.
- Honing, H., T. K. van den Berg, et al. (2004). "RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK." J Leukocyte Biol **75**: 523-528.
- Horvath, I., S. Loukides, et al. (1998). "Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress." Thorax **53**: 867-870.
- Hou, C., T. Kirchner, et al. (2003). "In vivo activity of a Phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions." J Pharmacol Exp Ther **309**: 697-704.
- Hu, G., A. T. Place et al. (2008). "Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules." Chemico-Biol Interac **171**: 177-189.
- Huy, N. T., D. T. Trang, et al. (2006). "Leukocyte activation by malarial pigment." Parasitol Int **55**(1): 75-81.
- Hunt, N. H. and R. Stocker (2007). "Heme moves to center stage in cerebral malaria." Nat Med **13**(6): 667-669.

- Hvidberg, V., M. B. Maniecki, et al. (2005). "Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes." Blood **106**(7): 2572-2579.
- Inohara, N. and G. Nuñez (2003). "NODs: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis." Nature Rev Immunol **3**: 371-382.
- Jaeschke, H. (2003). "Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284**: G15-G26.
- Jeney, V., J. Balla, et al. (2002). "Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme." Blood **100**: 879-887.
- Katanaev, V. (2001). "Signal transduction in neutrophil chemotaxis." Biochemistry **66**(4): 351-368.
- Koeppen, A. H., A. C. Dickson, et al. (2004). "Heme oxygenase in experimental intracerebral hemorrhage: the benefit of tin-mesoporphyrin." J Neuropathol Exp Neurol **63**(6): 587-597.
- Krishnamurthy, P. C., G. Du, et al. (2006). "Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter." Nature **443**(7111):586-589.
- Kristiansen, M., J. Graversen, et al. (2001). "Identification of the haemoglobin scavenger receptor." Nature **409**: 198-201.
- Kuhns, D., E. Nelson, et al. (2001). "Fibrinogen induces IL-8 synthesis in human neutrophils stimulated with Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine or Leukotriene B₄." J Immunol **167**: 2869-2878.
- Kuijpers, T. W. and D. Roos (2004). "Neutrophils: the power within." In: The innate immune response to infection. Eds.: Kaufmann, S. H. E., Medzhitov, R., Gordon, S. pp. 47-70.
- Le, Y., P. Murphy, et al. (2002). "Formyl-peptide receptors revisited." Trends Immunol **23**(11): 541-548.
- Lee, T.-S. and L.-Y. Chau (2002). "Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice." Nat Med **8**(3): 240-246.
- Lee, Y., B. Hybertson, et al. (2002). "Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces." J Lab Clin Med **140**: 312-319.
- Lentsch, A., H. Yoshidome, et al. (1998). "Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and KC." Hepatology **27**: 507-512.

- Lim, Y., A. Jenner, et al. (2000). "Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis." Kidney Int **58**: 1033-1044.
- Maines, M. (1997). "The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 517-554.
- Moestrup, S. and H. Moller (2004). "CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response." Ann Med **36**(5): 347-354.
- Muller, W. (2003). "Leukocyte-endothelial cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response." Trends Immunol **24**(6): 326-333.
- Nakao, A., L. Otterbein, et al. (2004). "Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel." Gastroenterology **127**(2): 595-606.
- Nath, K., J. Haggard, et al. (2000). "The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo." Am J Pathol **156**: 1527-1535.
- Nathan, C. (2006). "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." Nat Rev Immunol **6**(3): 173-182.
- Nauseef, W. M. (2007). "How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view." Immunol Rev **219**: 88-102.
- Neptune, E. R. and H. R. Bourne (1997). "Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs." Proc Natl Acad Sci USA **94**(26): 14489-14494.
- Neptune, E. R., T. Iiri, et al. (1999). "G α i is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors." J Biol Chem **274**: 2824-2828.
- Neves, S. R., P. T. Ram, et al. (2002). "G protein pathways." Science **296**(5573): 1636-1639.
- Niggli, V. (2003). "Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways." Int J Biochem Cell Biol **35**(12): 1619-1638.
- Nishida, M., Y. Maruyama, et al. (2000). "G α i and G α o are target proteins of reactive oxygen species." Nature **408**: 492-495.
- Noiri, E., T. Yokomizo, et al. (2000). "An in vivo approach showing the chemotactic activity of leukotriene B₄ in acute renal ischemic-reperfusion injury." Proc Natl Acad Sci USA **97**(2): 823-828.

- Noyer, C. M., S. Immenschuh, et al. (1998). "Initial heme uptake from albumin by short-term cultured rat hepatocytes is mediated by a transport mechanism differing from that of other organic anions." Hepatology **28**(1): 150-155.
- Okajima, K., N. Harada, et al. (2004). "Neutrophil elastase contributes to the development of ischemia-reperfusion-induced liver injury by decreasing endothelial production of prostacyclin in rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(6): G1116-G1123.
- Okuno, T, T. Yokomizo, et al. (2005). "Leukotriene B₄ receptor and the function of its helix 8." J Biol Chem **280**(37): 32049-32052.
- Otterbein, L., F. Bach, et al. (2000). "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway." Nat Med **6**(4): 422-428.
- Otterbein, L., M. Soares, et al. (2003). "Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme." Trends Immunol **24**(8): 449-455.
- Pamplona, A., A. Ferreira, et al. (2007). "Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria." Nat Med **13**(6): 703-710.
- Pease, J. and I. Sabroe (2002). "The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy." Am J Respir Med **1**(1): 19-25.
- Pettit, E. and F. Fay (1998). "Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis." Physiol Rev **78**(4): 949-967.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-2088.
- Prescott, S., G. Zimmerman, et al. (2000). "Platelet-Activating Factor and related lipid mediators." Annu Rev Biochem **69**: 419-445.
- Quaye, I. K. (2008). "Haptoglobin, inflammation and disease." Trans R Soc Trop Med Hyg **102**(8): 735-742.
- Quigley, J. G., Z. Yang, et al. (2004). "Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis." Cell **118**(6): 757-766.
- Raad, H., M. H. Paclét, et al. (2009). "Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/Nox2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox." FASEB J **23**(4): 1011-1022.
- Ray, R. and A. M. Shah (2005). "NADPH oxidase and endothelial cell function." Clin Sci **109**: 217-226.

- Ridley, J. (2001). "Rho proteins, Pi 3-kinases, and monocyte/macrophage motility." FEBS Lett **498**: 168-171.
- Rollins, B. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-928.
- Rose, J., J. Foley, et al. (2004). "On the mechanism and significance of ligand-induced internalization of human neutrophil chemokine receptors CXCR1 and CXCR2." J Biol Chem **279**(23): 24372-24386.
- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-242.
- Rot, A. and U. von Andrian (2004). "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells." Annu Rev Immunol **22**: 891-928.
- Ryter, S. W. and R. M. Tyrrell (2000). "The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties." Free Radic Biol Med **28**(2): 289-309.
- Sadhu, C., B. Masinovsky, et al. (2003). "Essential role of phosphoinositide 3-kinase δ in neutrophil directional movement." J Immunol **170**: 2647-2654.
- Sassa, S. (2004). "Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IXalpha, carbon monoxide?" Antioxid Redox Signal **6**(5): 819-824.
- Segal, A. W. (2005). "How neutrophils kill microbes." Annu Rev Immunol **23**: 197-223.
- Serracino-Inglott, F., N. A. Habib, et al. (2001). "Hepatic ischemia-reperfusion injury." Am J Surg **181**(2): 160-166.
- Shayeghi, M., G. O. Latunde-Dada, et al. (2005). "Identification of an intestinal heme transporter." Cell **122**(5): 789-801.
- Shibata, F., K. Konishi, et al. (2002). "Chemokine receptor CXCR2 activates distinct pathways for chemotaxis and calcium mobilization." Biol Pharm Bull **25**(9): 1217-1219.
- Shiu, Y. T., M. M. Udden, et al. (2000). "Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells." Blood **95**(10): 3232-3241.
- Simões, R. L. and I. M. Fierro (2005). "Involvement of the Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway on human monocyte chemotaxis induced by ATL-1, an aspirin-triggered lipoxin A₄ synthetic analog." J Immunol **175**: 1843-1850.
- Soares, M., M. Seldon, et al. (2004). "Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation." J Immunol **172**: 3553-3563.

- Souza, D. G., V. Pinho, et al. (2002). "Effect of a BLT receptor antagonist in a model of severe ischemia and reperfusion injury in the rat." Eur J Pharmacol **440**(1): 61-69.
- Su, D., R. Roth et al. (1999). "Hemoglobin infusion augments the tumor necrosis factor response to bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) in mice." Crit Care Med **27**(4): 771-778.
- Tager, A. and A. Luster (2003). "BLT1 and BLT2: the leukotriene B₄ receptors." Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids **69**: 123-134.
- Takaoka, Y., S. Matsuura, et al. (1999). "The effect of mesoporphyrin on the production of cytokines by inflammatory cells in vitro." Jpn J Pharmacol **80**: 33-40.
- Tang, X. D., R. Xu, et al. (2003). " Haem can bind to and inhibit mamalian calcium-dependent Slo1 BK channels." Nature **425**(6957): 531-535.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nat Immunol **2**(2): 129-134.
- Tolosano, E., S. Fagoonee, et al. (2002). "Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin/hemopexin double-null mice after acute hemolysis." Blood **100**: 4201-4208.
- Tolosano, E., E. Hirsch, et al. (1999). "Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice." Blood **94**(11): 3906-3914.
- Turhan, A., L. A. Weiss, et al. (2002). "Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm." Proc Natl Acad Sci USA **99**(5): 3047-3051.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." Annu Rev Immunol **20**: 825-852.
- Vachharajani, T., J. Work, et al. (2000). "Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**: H1613-H1617.
- van Buul, J. and P. Hordijk (2004). "Signaling in leukocyte transendothelial migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**: 1-11.
- Vicente, A., M. Guillén, et al. (2003). "Participation of heme oxygenase-1 in a model of acute inflammation." Exp Biol Med **228**: 514-516.
- Vicente-Manzanares, M. and F. Sánchez-Madrid (2004). "Role of the cytoskeleton during leukocyte responses." Nature Rev Immunol **4**: 110-122.

- Wagener, F., N. Abraham, et al. (2001a). "Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation." TRENDS Pharmacol Sci **22**(2): 52-54.
- Wagener, F., J. da Silva, et al. (1999). "Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediated endothelial ICAM-1 expression." J Pharmacol Exp Ther **291**: 416-423.
- Wagener, F., A. Eggert, et al. (2001b). "Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase." Blood **98**: 1802-1811.
- Wagener, F., E. Feldman, et al. (1997). "Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in vascular endothelial cells." Proc Soc Exp Biol Med **216**(456-463).
- Wagener, F., H.-D. Volk, et al. (2003). "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation." Pharmacol Rev **55**: 551-571.
- Wagner, J. and R. Roth (2000). "Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature." Pharmacol Rev **52**: 349-374.
- Wakasugi, K., T. Nakano, et al. (2003). "Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide dissociation inhibitor." J Biol Chem **278**(38): 36505-36512.
- Wang, W., D. Smith, et al. (2004). "Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats." Hepatology **40**(2): 424-433.
- Ward, P. (2004). "The dark side of C5a in sepsis." Nature Rev Immunol **4**: 133-142.
- Ward, S. (2004). "Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation?" Trends Immunol **25**(2): 67-74.
- Willis, D., A. Moore, et al. (1996). "Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response." Nat Med **2**: 87-90.
- Woo, C.-H., M.-H. Yoo et al. (2003). "Transepithelial migration of neutrophils in response to leukotriene B₄ is mediated by a reactive oxygen species-extracellular signal-regulated kinase-linked cascade." J Immunol **170**: 6273-6279.
- Worthington, M. T., S. M. Cohn, et al. (2001). "Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(6): G1172-1177.
- Wu, D., C.-K. Huang, et al. (2000). "Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses." J Cell Sci **113**: 2935-2940.

- Yamashita, K., J. McDaid, et al. (2004). "Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts." FASEB J **18**(6): 765-767.
- Yang, H., H. Wang, et al. (2002). "Globin attenuates the innate immune response to endotoxin." Shock **17**(6): 485-490.
- Yokomizo, T., T. Izumi, et al. (1997). "A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis." Nature **387**: 620-624.
- Yokomizo, T., K. Kato, et al. (2000a). "A second leukotriene B₄ receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders." J Exp Med **192**(7): 421-431.
- Yokomizo, T., K. Masuda, et al. (2000b). "Leukotriene B₄ receptor - Cloning and intracellular signaling." Am J Respir Crit Care Med **161**: S51-S55.
- Yoo, Y.-M., K.-M. Kim, et al. (1999). "Hemoglobin toxicity in experimental bacterial peritonitis is due to production of reactive oxygen species." Clin Diag Lab Immunol **6**(6): 938-945.
- Zhang, D. X. and D. D. Gutterman (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**: H2023-H2031.
- Zhu, L. and P. He (2006). "fMLP-stimulated release of reactive oxygen species from adherent leukocytes increases microvessel permeability." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**: H365-H372.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

7. ANEXOS

7.1. “Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors.” The Journal of Biological Chemistry, 2007.

Este trabalho mostra que o heme induz a migração de neutrófilos e a geração de espécies reativas de oxigênio através da ativação de proteína G α i, PI3K, PLC- β , RhoK, ERK e p38. Além disso, a mesoporfirina IX inibe seletivamente a migração dos neutrófilos induzidas por heme.

7.2. “Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4.” The Journal of Biological Chemistry, 2007.

Este estudo mostra que o heme induz a secreção de TNF- α por macrófagos de maneira dependente do receptor TLR-4, CD14 e MYD-88. Por outro lado, o recrutamento de neutrófilos, a geração de espécies reativas de oxigênio e a expressão de heme oxigenase-1 foram independentes de TLR-4.

7.3. “Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae).” Toxicon, 2007.

Este trabalho caracteriza as atividades enzimáticas presentes nos venenos das serpentes *Bothriopsis bilineata* e *Bothriopsis taeniata*. Além disso, o recrutamento de neutrófilos induzido por esses venenos é dependente da atividade de metaloproteases presentes nos venenos e de metabólitos do ácido araquidônico, provavelmente o LTB₄.

7.4. “*Trypanosoma cruzi* infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine.” *Infection and Immunity*, 2008.

Este estudo demonstra que a saliva do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, vetor da Doença de Chagas, é um potente indutor da quimiotaxia de neutrófilos humanos. Além disso, a saliva e a lisofosfatidilcolina (LPC) bloquearam a produção de óxido nítrico por macrófagos expostos ao *T. cruzi*. A injeção de saliva ou LPC na pele de camundongos na presença do parasita aumenta a parasitemia sanguínea.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)