

Guilherme Bastos Fortes

Heme induz morte celular dependente de RIP1 em macrófagos e neutrófilos.

Orientador: Dr. Marcelo Torres Bozza



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Rio de Janeiro
Abril 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Guilherme Bastos Fortes

Heme induz morte celular dependente de RIP1 em macrófagos e neutrófilos.



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

Orientador: Dr. Marcelo Torres Bozza



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Rio de Janeiro
Abril 2010

Fortes, Guilherme Bastos

Heme induz morte celular dependente de RIP1 em macrófagos e neutrófilos.

/ Guilherme Bastos Fortes – Rio de Janeiro, 2010

X, 82

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2010.

Orientador: Marcelo Torres Bozza

Referências Bibliográficas: f. 82

1. Heme 2. Necroptose 3. Macrófagos e Neutrófilos 4. Viabilidade celular
5. Espécies Reativas de Oxigênio 6. TNF I. Bozza, Marcelo Torres. II. UFRJ,
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Microbiológicas
(Microbiologia). III. Heme induz morte celular dependente de RIP1 em
macrófagos e neutrófilos.

Guilherme Bastos Fortes

Heme induz morte celular dependente de RIP1 em macrófagos e neutrófilos.

Rio de Janeiro, abril de 2010.

Aprovado por:

Dr. Marcelo Torres Bozza, UFRJ

Dra. Elvira Maria Saraiva, UFRJ

Dra. Maria Augusta Arruda, FIOCRUZ

Dr. Célio Geraldo Freire de Lima, UFRJ

Dra. Juliana Echevarria Lima, UFRJ (Revisora)

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus todo o apoio durante a realização desse trabalho.

À minha família que sempre estava preocupada comigo, obrigado pela “paciência”, atenção e carinho.

À querida Elizabeth, palavras não são suficientes para expressar tudo que você representa para mim. Muito obrigado “Beth”.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Torres Bozza, por ter me aceito no seu Laboratório, por toda a confiança depositada em mim, pela ajuda, pelas risadas e pelos ensinamentos de vida.

À Patrícia e Letícia, amigas queridas, pela ajuda sempre constante, pela alegria que aliviava o cansaço dos experimentos e estudos, pelas conversas e risadas, pelos preciosos conselhos científicos e/ou humanos. “Paty”, obrigado por me receber em sua casa e “Lê” eu ainda vou à sua algum dia, promessa.

Ao Fabianno, sempre atento as datas de atualização de todas as revistas importantes, sempre “apreciando” as minhas piadas “inovadoras”, acrescentar sempre algo importante em todas as minhas idéias e experimentos (obrigado pelos desafios, me fizeram evoluir) e também por me acompanhar a muitos jogos do Flamengo (uns 3 no total).

À Danielle, por sua imensa paciência, dedicação e atenção comigo antes, durante e após os experimentos. Desculpe as minhas demoras, pela manhã.

Aos meus amigos do laboratório, Tatiana, Christine, Raquel, Iranaia, Feijó, Jacilene, Marta, Fernando, pela ajuda, pelas sugestões, pelas conversas variadas e as risadas e por alegrarem sempre o lab. Sentirei muita saudade de todos vocês nesse laboratório de loucos!!!

À todos do laboratório do prof. Franklin. Pela solicitude e imensa paciência esperando que eu saísse da câmara escura, dando sugestões para melhorar os resultados dos experimentos. Oferecendo seus reagentes, sempre funcionando, e pensamentos positivos sinceros. Obrigado mesmo.

À CAPES, FAPERJ e PRONEx pelo apoio financeiro indispensável para a realização desse trabalho.

"Insanidade: fazer as mesmas coisas várias e várias vezes e esperar resultados diferentes." Albert Einstein

Guilherme Bastos Fortes

Heme induz morte celular dependente de RIP1 em macrófagos e neutrófilos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

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

Algumas das doenças infecciosas humanas mais perigosas, devido à sua severidade e/ou distribuição global, tais como anemia hemolítica, malária, febres hemorrágicas (Dengue, Febre da Criméia, vírus Marbug e vírus Ebola) e leptospirose, têm como fenômeno central na sua fisiopatologia a hemólise intra e extravascular. Níveis elevados de heme livre são encontrados em pacientes com essas doenças. O heme livre induz estresse oxidativo, possui efeitos inflamatórios e também é citotóxico para vários tipos celulares, mas este mecanismo não está completamente elucidado. Nesse trabalho, investigamos mecanismos envolvidos no efeito citotóxico do heme em macrófagos murinos e neutrófilos humanos. A viabilidade celular foi determinada pelas técnicas de MTT, exclusão de azul de trypan e detecção de desidrogenase lática. O TNF foi quantificado pela técnica de ELISA e a produção de ROS foi medida por citometria de fluxo. Nós avaliamos o efeito do heme na sobrevivência de macrófagos peritoneais murinos e neutrófilos humanos, e observamos que a estimulação com heme reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 50%, na ausência de soro fetal bovino (SFB). A morte celular induzida pelo heme em macrófagos foi inibida pela adição de soro, mesmo 2 horas após o estímulo de heme. A geração de espécies reativas de oxigênio também está associada à morte induzida pelo heme, pois o uso do N-acetil cisteína (Nac) bloqueou a morte induzida pelo heme em macrófagos. FIGUEIREDO *et al.*, 2007 demonstraram que a incubação de macrófagos com heme na ausência de SFB produzem TNF, sugerindo um mecanismo de morte celular. Além disso, macrófagos TNFR-1^{-/-} e TLR4^{-/-} são resistentes a esse processo de indução de morte. A estimulação de macrófagos TLR4^{-/-} com heme na presença TNF recombinante recuperou a susceptibilidade a morte celular dessas células. Os resultados nos levaram a propor que o heme seria capaz de induzir a Necroptose, processo de morte celular programada com características morfológicas semelhantes à necrose. Utilizando a Necrostatina-1 observamos a inibição desse processo tanto em macrófagos quanto em neutrófilos. A Necrostatina-1 diminuiu a produção de TNF induzido pelo heme em macrófagos. Contudo, não alterou a geração de ROS pelo heme. Os resultados mostraram que o heme induz necroptose em macrófagos e neutrófilos, e este efeito citotóxico depende de um eixo de sinalização TLR4-TNF-TNFR1 e a geração de ROS.

Palavras-chave: Heme; Necroptose; ROS; TNF; viabilidade celular; macrófagos e neutrófilos.

Rio de Janeiro
Abril de 2010

Guilherme Bastos Fortes

Heme induz morte celular dependente de RIP1 em macrófagos e neutrófilos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Abstract da Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Some of the most threatening human infectious diseases because of its severity and/or its global distribution, such as sickle cell anemia, trauma, malaria, hemorrhagic fevers (Dengue, Crimean Fever, Marburg and Ebola viruses), Leptospirosis and septic shock, have intra or extra vascular hemolysis as one of the central phenomena in its pathophysiology. High levels of free heme are present in the serum of patients having these diseases. Free heme induces oxidative stress, has proinflammatory effects and also has cytotoxic effect in several cell types, but the mechanism is not fully understood. In this work, we investigate the mechanisms involved in heme cytotoxic effect on murine macrophages and human neutrophils. Cell viability was determined using MTT assay, Trypan-blue dye exclusion method and Lactate dehydrogenase (LDH) detection. TNF was quantified in supernatants by ELISA and ROS was measured by Flow cytometry. We evaluated the effect of heme in the survival of elicited peritoneal macrophages (wild-type mice, *TLR4*^{-/-} and *TNFR-I*^{-/-}) and human neutrophils. We observed that stimulation with heme reduced leukocyte viability in approximately 50% after 6h in the absence of fetal calf serum (FCS). The cell death induced by heme was inhibited by FCS, added up to 2 hours after stimulation with heme. ROS induction by heme participates in this death mechanism, because N-acetyl cysteine (Nac) inhibited cell death caused by heme in macrophages. FIGUEIREDO *et al.*, 2007 showed that macrophages stimulated with heme produce TNF in absence of serum, suggesting a death mechanism. Besides that, *TNFR-I*^{-/-} and *TLR4*^{-/-} macrophages are resistant to cell death, but *TLR4*^{-/-} macrophages stimulated with heme plus rTNF recovered the death mechanism. These results suggested that heme can induce Necroptosis, a programmed cell death with necrotic appearance. Necrostatin-1 inhibited this process in macrophages and neutrophils, also reduced TNF production induced by heme in macrophages. Interestingly, Necrostatin-1 did not alter the production of ROS by heme. Heme induced a specialized pathway of programmed necrosis, necroptosis. These results show that heme can induce necroptosis in macrophages and neutrophils, and this cytotoxicity effect depends on a TLR4-TNF-TNFR-I signaling axis and ROS generation.

Key words: Heme, Necroptosis, ROS, TNF, cell viability, macrophages and neutrophils.

Rio de Janeiro

Abril de 2010

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO	1
1.1-Heme	1
1.2- Morte celular	7
1.2.1- Mecanismo de Morte Celular	9
1.2.1.1- Apoptose	9
1.2.1.2- Necrose	16
1.2.1.2.1- Necroptose: A necrose regulada	17
1.3- TNF/TNFR	19
1.4- Heme e Morte celular	21
2- HIPÓTESE	23
3- OBJETIVOS	24
3.1- Objetivo geral	24
3.2- Objetivos específicos	24
4- MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1- Animais	25
4.2- Reagentes	25
4.3- Obtenção e estimulação de macrófagos peritoneais: Cultura de macrófagos	26
4.4- Purificação e estimulação de Neutrófilos Humanos	26
4.5- Experimentos de Viabilidade	27
4.5.1- Azul de Trypan	27
4.5.2- Ensaio de MTT	28
4.5.3- Ensaio de LDH	28
4.6- Dosagem de citocinas	29
4.7- Ensaio de geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	30
4.8- Método para análise dos resultados	30
5- RESULTADOS	31
5.1- Heme induz a morte de macrófagos tempo e dose dependente	31
5.2- A presença de soro fetal inibe o mecanismo citotóxico do heme	34
5.3- Envolvimento do TLR4 no efeito citotóxico do heme	38

5.4- Envolvimento de TNF no mecanismo de morte celular_____	40
5.4.1- O mecanismo de morte depende da presença de receptor de TNF____	42
5.5- Mecanismo de morte celular dependente da atividade oxidante do heme_____	44
5.6- Necrostatina-1 (Nec-1) inibe a morte celular induzida pelo heme_____	46
5.6.1- O tratamento com “Nec-1” reduz a produção de TNF induzida pelo heme_____	48
5.6.2- A ação protetora da Nec-1 independe da inibição da produção de TNF_____	49
5.6.3- Nec-1 não altera a produção de espécies reativas induzida pelo heme_____	50
5.7- Efeito do heme sobre a viabilidade de neutrófilos_____	53
6- DISCUSSÃO_____	55
7- CONCLUSÃO_____	60
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS_____	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Fator indutor de apoptose
ANT	Translocador de nucleotídeos adenina
Apaf-1	Fator ativador de protease apoptótica 1
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	Proteína associada ao Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B 2
BSA	Albumina do soro bovino
BSS	Solução salina balanceada
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CD14	Complexo de diferenciação 14
CD95	Complexo de diferenciação 95
CMH2DCFDA	5-(and-6)-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl éster
CO	Monóxido de Carbono
CoA	Co-enzimaA
Ctrl	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucléico
endoG	Endonuclease G
FADD	Proteína associada ao Fas com domínio de morte
Hb	Hemoglobina
HO	Hemeoxigenase
HO-1	Hemeoxigenase-1

Hp	Haptoglobina
Hx	Hemopexina
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intra-venoso
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular tipo 1
IRAK	Quinases associadas ao receptor da interleucina-1
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LDH	Deidrogenase láctica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
MYD88	Fator de diferenciação mielóide 88
Nac	N-acetilcisteína
NAD/FMS	Difosfopiridino nucleótido + fenazina metosulfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Nec-1	Necrostatina-1
NFκB	Fator nuclear Kappa B
OPD	1,2-Diaminobenzeno
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RIP1	Proteína de interação de receptores 1

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
Smac/Diablo	Segundo ativador mitocondrial de caspase
TLR3	Receptor tipo 3 semelhante aos Toll de Drosophila
TLR-4	Receptor semelhante ao Toll 4
TLRs	Receptores semelhantes ao receptor Toll de Drosophila
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFr	Molécula de TNF recombinante
TNFR-1	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1
TRADD	Proteína com domínio de morte associada ao receptor tipo 1 de TNF
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão de células vasculares tipo 1
VDAC	Canal de anions voltagem-dependente
ZVAD-fmk	Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune inato apresenta um papel decisivo no processo de controle da infecção, atuando em diversas etapas, como na eliminação do agente infeccioso, na ativação da resposta imune adaptativa e também no remodelamento tecidual (revisado por CHANSON *et al.*, 2005). Contudo, existem doenças infecciosas, nas quais a atividade imune e o processo inflamatório subsequente além de proporcionarem uma proteção contra o patógeno e/ou suas moléculas, também podem estar decisivamente envolvidas com sua patogênese, induzindo morte celular extensa por exemplo. Sendo assim, o processo inflamatório pode ser associado a um processo dual, pois ao mesmo tempo em que ele pode se - apresentar protetor, também pode ser decisivo no desenvolvimento e progressão de lesão tecidual observada em diversas patologias (revisado por ZHANG *et al.*, 2005; revisado por AMANTEA *et al.*, 2009).

As doenças que apresentam em seu desenvolvimento processos de hemólise intra e extravascular ou dano tecidual extenso podem causar aumento na concentração de hemoglobina e de heme livre, como nos exemplos da anemia falciforme, trauma, malária (PAMPLONA *et al.*, 2007), febres hemorrágicas (Febre da Criméia, Vírus Marbug e Ebola), leptospirose, choque séptico, talassemias, esferocitose hereditária (revisado por CARRELL & WINTERBOURN, 1980; DALY *et al.*, 2006; HUA *et al.*, 2007).

A hemoglobina e o heme livre podem induzir um processo inflamatório local, com recrutamento leucocitário, aumento da expressão de moléculas de adesão, indução de citocinas e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (revisado por WAGENER *et al.*, 2003; revisado por JAESCHKE & LEMASTERS, 2003).

1.1- Heme

A molécula de heme (Ferro Protoporfirina IX) é composta por um complexo não-protéico formado de um átomo de ferro ligado a um anel

tetrapirrólico (fig.1) (revisado por MAINES, 1988; revisado por PONKA, 1999; revisado por FURUYAMA, KANEKO & VARGAS, 2007).

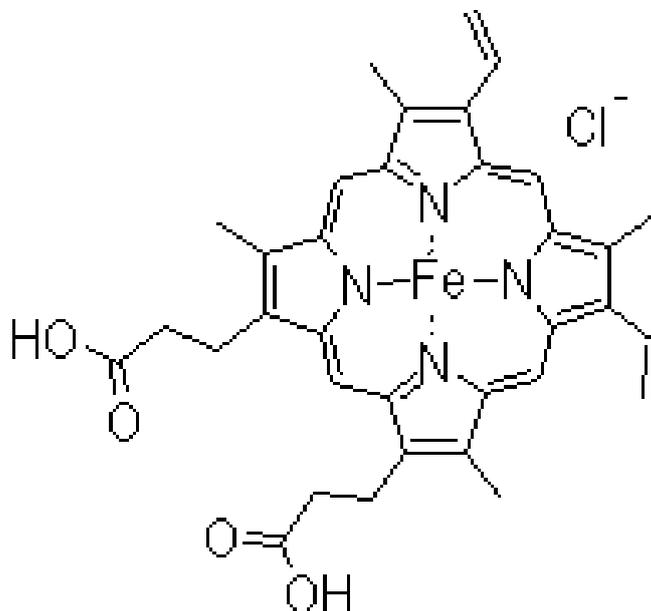


Figura 1: Esquema demonstrando a estrutura da molécula de heme (<http://www.frontiersci.com/detail.php?FSIcat=H651-9>).

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. Ele funciona como grupamento prostético de várias proteínas, e sua função é determinada pelo polipeptídeo ligado a ele. Quando associado à hemoglobina ou a mioglobina, 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 (revisado por BOWMAN & BREN, 2008).

Além disso, o heme é indispensável em outros sistemas enzimáticos, incluindo ciclooxigenase (COX) e óxido nítrico sintase (NOS). Ele também é importante no controle da expressão de várias proteínas, como globina,

enzimas envolvidas na biossíntese do próprio heme, citocromos, mieloperoxidase, hemeoxigenase-1 e receptor de transferrina (revisado por WAGENER *et al.*, 2003).

Sua síntese ocorre em todas as células humanas nucleadas a partir de glicina e succinil-CoA, em um processo que envolve uma série de reações enzimáticas que tem lugar, parcialmente, na mitocôndria e no citoplasma (revisado por WAGENER *et al.*, 2003).

O heme livre pode ser gerado pela oxidação de hemoproteínas, em condições patofisiológicas, como a degradação da hemoglobina em eventos de hemólise (revisado por GOZZELINO, JENEY & SOARES, 2010).

Duas proteínas plasmáticas desempenham um papel fundamental na proteção contra os efeitos tóxicos do heme livre, a hemopexina (Hx) e a haptoglobina (Hp) (revisado por PONKA, 1999; TOLOSANO *et al.*, 1999).

A degradação fisiológica do heme é catalisada pela enzima Heme Oxigenase (HO), gerando quantidades equimolares de biliverdina, ferro e monóxido de carbono. A biliverdina é reduzida, subsequentemente pela ação da enzima biliverdina redutase em bilirrubina, o ferro é reciclado para a produção de heme (fig. 2) (revisado por PONKA, 1999; STOCKER *et al.*, 1987; SINGLETON & LASTER, 1965; revisado por KAPITULNIK & MAINES, 2009; revisado por PIANTADOSI, 2008).

Duas isoformas da HO foram descritas em humanos e roedores (HO-1 e 2) (revisado por GOZZELINO, JENEY & SOARES, 2010). A isoforma 2 é expressa constitutivamente em cérebro, testículos, endotélio e fígado. Entretanto, a HO-1, também conhecida como Hsp-32, é induzida em diferentes tecidos por uma ampla variedade de estímulos como estresse oxidativo, hipóxia, metais pesados, radiação UV, calor, citocinas inflamatórias e óxido nítrico (revisado por PONKA, 1999; revisado por SHIBAHARA, 2003).

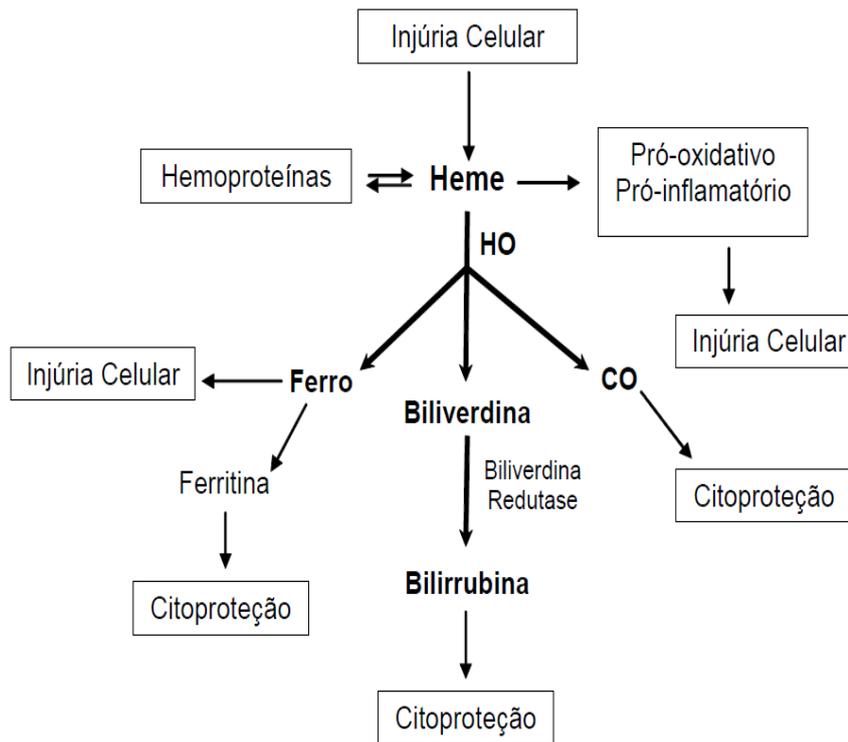


Figura 2: Esquema de degradação do heme (adaptado de WAGENER *et al.*, 2003). O heme derivado das hemoproteínas ou recém-sintetizado é degradado pela HO em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro. A biliverdina é convertida em bilirrubina pela ação da biliverdina redutase. O ferro é diretamente sequestrado pela ferritina.

A relevância da HO-1 na degradação do heme e a sua participação na inflamação foi demonstrada em pacientes e animais deficientes desta enzima. Sua ausência eleva os níveis de heme no soro, gerando efeitos oxidativo e/ou inflamatórios, tais como anemia, acumulação de ferro nos rins e fígado, esplenomegalia, injúria endotelial, entre outras (revisado por SOARES & BACH, 2009; AVOGARO, PAGNIN & CALO, 2003; TAKAKI *et al.*, 2010; TOLOSANO *et al.*, 1999; revisado por PAE & CHUNG, 2009).

Além disso, fibroblastos deficientes de HO-1 produzem quantidades elevadas de radicais livres quando tratados com heme e apresentam

hipersensibilidade a citotoxicidade causada pelo heme (CHENG *et al.*, 2009; TRUE *et al.*, 2007; revisado por POSS & TONEGAWA, 1997A; revisado por POSS & TONEGAWA, 1997B).

O heme é capaz de estimular a transcrição do gene da HO-1 tanto *in vivo* quanto *in vitro* (revisado por SIKORSKI *et al.*, 2004). Os produtos de degradação do heme pela HO-1 apresentam função antioxidante, antiinflamatória e anti-apoptótica (revisado por SIKORSKI *et al.*, 2004). Sendo assim, os efeitos deletérios do heme podem ser contidos pela expressão dessa enzima.

Em condições normais ocorre a liberação de hemoglobina (Hb) no plasma durante a maturação de eritroblastos e destruição de eritrócitos senescentes. Entretanto, em condições patológicas de hemólise intravascular, como por exemplo hemoglobinopatias, reperfusão pós-isquêmica e malária, grandes quantidades de hemoglobina são liberadas no plasma. A oxidação da hemoglobina para sua forma metahemoglobina desestabiliza a associação do heme com a globina, liberando o heme desta molécula. Esse fato justifica as elevadas quantidades de heme livre encontradas no soro de pacientes com estas patologias. (PAMPLONA *et al.*, 2007; revisado por FERREIRA *et al.*, 2008)

O heme atua como uma molécula pró-inflamatória, elevando a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e em leucócitos, aumentando significativamente a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina em células endoteliais da veia umbilical humana (WAGENER *et al.*, 1997; WAGENER *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 intravenosa de heme (WAGENER *et al.*, 2001).

O heme induz a migração de neutrófilos humanos *in vitro* de maneira dependente da ativação de proteína quinase C (PKC), dispara a explosão oxidativa e promove polimerização de actina, indicando que heme é um potente

ativador de neutrófilos (GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2002). Dados do nosso laboratório mostram que o heme e seus diversos análogos são capazes de induzir a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (PORTO *et al.*, 2007).

Os mecanismos utilizados pelo heme para exercer seus efeitos ainda não estão completamente elucidados. Alguns autores acreditam que os mecanismos envolvem a natureza anfipática da molécula de heme, permitindo que ele intercale nas membranas celulares e ativando vias de sinalização dentro da célula (revisado por WAGENER *et al.*, 2003; BALLA *et al.*, 1993; BALLA *et al.*, 2000). Outros estudos demonstraram que proteínas na superfície celular são capazes de ligar heme e interagem diretamente com o heme indicando, que ele não precisaria entrar na célula para agir (revisado por GALBRAITH, 1990; WORTHINGTON *et al.*, 2001; QUIGLEY *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2003; SHAYEGHI *et al.*, 2005; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Em um trabalho recente do nosso laboratório, foi mostrado que o heme é capaz de induzir a secreção de TNF por macrófagos de maneira dependente de receptor semelhante ao Toll 4 (TLR-4), complexo de diferenciação 14 (CD14) e fator de diferenciação mielóide 88 (MYD88), indicando um efeito do heme como molécula sinalizadora do sistema imune (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Essas evidências demonstram que algumas atividades do heme podem ser induzidas mediante a utilização de receptores de superfície.

Um artigo recente demonstrou que o heme livre desempenha um papel importante na fisiopatologia de malária cerebral murina (PAMPLONA *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem que o heme desempenha um importante papel em patologias estéreis ou infecciosas que apresentem hemólise, interferindo no processo inflamatório. Isso ocorre tanto por indução de morte celular quanto por potencializar o efeito inflamatório de moléculas associadas a patógenos.

Além desses efeitos inflamatórios, 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 *et al.*, 2002; revisado por SASSA, 2004; BALLA *et al.*, 2000). Portanto, quando liberado das hemoproteínas o heme promove a formação de radicais de oxigênio, participando desta forma na oxidação de lipídios, proteínas e DNA (revisado por BALLA *et al.*, 2003). O heme livre pelas suas características hidrofóbicas possui a capacidade de se inserir nas membranas plasmáticas e, mediante a formação de espécies reativas do oxigênio participa na peroxidação de lipídios de membrana (BALLA *et al.*, 1991 A; BALLA *et al.*, 1991B; revisado por MILLER & SHAKLAI, 1994).

1.2- Morte celular

A morte celular é um fenômeno comum durante diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de tumores, a hematopoiese, na regulação de populações de células do sistema imune (revisado por MEIER, FINCH & EVAN, 2000; revisado por RANGANATH & NAGASHREE, 2001; revisado por ZHANG *et al.*, 2005). Sendo assim, após um número característico de divisões celulares células não-transformadas envelhecem, param de dividir-se e morrem (revisado por CONLON & RAFF, 1999).

Os processos de morte celular apresentam um sistema de classificação bastante complexo utilizando critérios morfológicos, enzimáticos e aspectos funcionais (revisado por KROEMER *et al.*, 2009).

Os estudos clássicos em morte celular de Kerr, Wyllie e Currie evidenciaram que as células direcionavam-se para pelo menos dois tipos principais de morte celular: Apoptose e Necrose (fig.3) (KERR, WYLLIE & CURRIE, 1972).

A apoptose é caracterizada, como um sistema ativo e programado, e por aspectos morfológicos específicos, como a retração de pseudópodes, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, pouca ou nenhuma modificação ultra-estrutural das organelas citoplasmáticas e

formação dos corpos apoptóticos (com manutenção da integridade da membrana celular) (revisado por BAEHRECKE, 2002).

Inicialmente, a necrose foi considerada uma forma de morte passiva e desregulada, mas que apresenta um padrão de degeneração rápida, com inflamação local, liberação dos produtos citoplasmáticos pelo rompimento da membrana plasmática, e principalmente, a ausência de mecanismos de sinalização que direcionem a morte da célula (revisado por ZIEGLER & GROSCURTH, 2004; revisado por GUIMARÃES & LINDEN, 2004). Todavia, estudos recentes vêm demonstrando que o fenômeno necrótico pode apresentar mecanismo de regulação no seu desencadeamento independente de caspases, como a via da proteína de interação de receptores 1 (RIP-1) (HOLLER *et al.*, 2000; DEGTEREV *et al.*, 2005; DEGTEREV *et al.*, 2008).

A morte por autofagia foi caracterizada posteriormente às duas anteriores. Ela é morfologicamente definida pelo desenvolvimento massivo de vacúolos autofágicos (membrana dupla) no citoplasma, não apresenta condensação da cromatina e diferentemente das células apoptóticas, a sua retirada do sistema apresenta pouca ou nenhuma relação com a atividade de fagócitos profissionais (revisado por BAEHRECKE, 2005; revisado por LEVINE & YUAN, 2005).

Além desses, existem outros tipos de morte celular que ainda não estão bem caracterizados, sendo consideradas mortes atípicas: a Cornificação, “catástrofe mitótica”, “Anoikisis”, Excitotoxicidade, “Degeneração de Wallerian”, “Paraptosis”, “Pyroptosis”, “Pyronecrosis”, “Entosis” (revisado por KROEMER *et al.*, 2009).

1.2.1- Mecanismos de Morte Celular

1.2.1.1- Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada com grande eficiência e que requer a síntese *de novo* de proteínas (KERR, WYLLIE & Currie, 1972).

O processo apoptótico resulta na formação de pequenas vesículas, denominadas “corpos apoptóticos”, as quais se apresentam com cromatina condensada e membranas intactas (revisado por HORKY *et al.*, 2002). As células apoptóticas podem apresentar moléculas em sua superfície, como por exemplo, resíduos de fosfatidilserina na porção mais externa da membrana, que sinalizam para a sua fagocitose por fagócitos profissionais antes do rompimento e consequente desencadeamento de resposta inflamatória indesejada (revisado por MIGNOTTE & VAYSSIERE, 1998; revisado por OPFERMAN, 2008).

Essas alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (revisado por SARASTE & PULKKI, 2000).

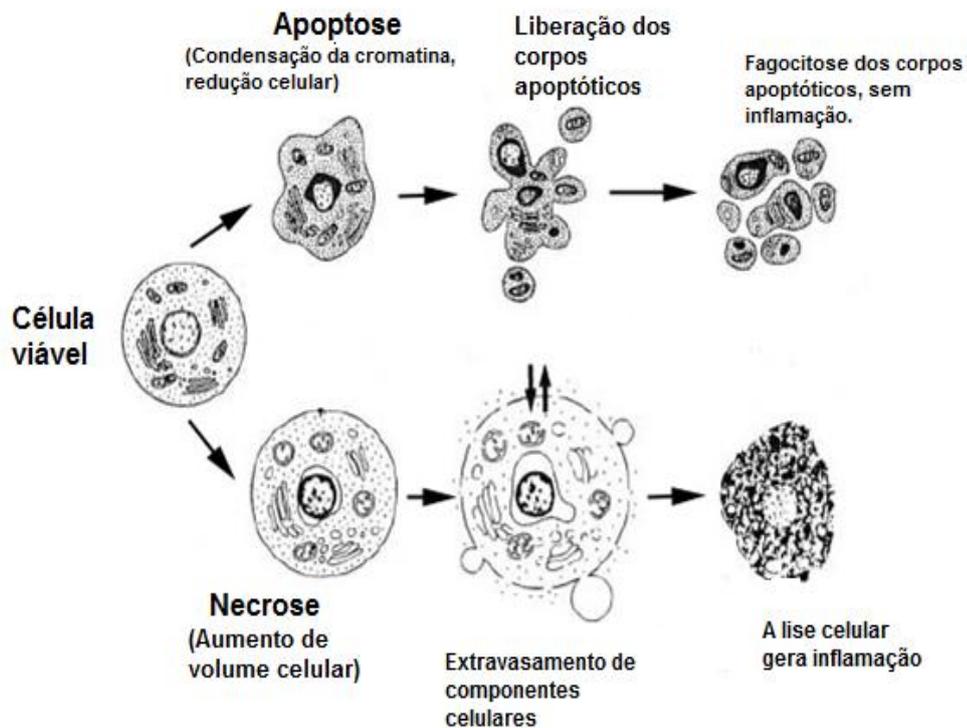


Figura 3: Comparação entre apoptose e necrose. (Adaptado, VAN CRUCHTEN & VAN DEN BROECK, 2002)

O início dos estudos da regulação gênica na apoptose foram realizados em *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), isolando células deficientes para vários aspectos da morte celular programada. A análise genética desses mutantes identificou um grupo de genes que atuam como reguladores positivos ou negativos desse processo biológico (revisado por BAKER & REDDY, 1998).

Trabalhos posteriores demonstraram que a morte em *C. elegans* é controlada por genes da família ced: ced-3, ced-4 e ced 9, e outras proteínas associadas. O gene Ced-3 é um gene essencial para a execução do programa de morte celular e seus produtos proteicos apresentam grande homologia com uma família de cisteína proteases humanas, denominadas caspases (ALNEMRI *et al.*, 1996). As caspases são cisteínas proteases (caracterizadas

pela presença de resíduo de cisteína no sítio ativo) apresentando a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (revisado por NICHOLSON & THORNBERRY, 1997). As caspases são a fonte das mudanças morfológicas e bioquímicas características da apoptose (revisado por REED, 2000). Elas são produzidas na forma de zimogênio (pró-caspases), e necessitam de clivagem enzimática para tornarem-se ativas (revisado por HENGARTNER, 2000). As enzimas ativas são compostas por heterotrâmeros com 2 subunidades maiores e duas menores, com dois sítios ativos por molécula (revisado por THORNBERRY, 1998).

A atividade das caspases direciona a apoptose, clivando seus substratos e atuando em sistema de cascata, gerando a condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios na membrana celular, os quais sinalizam para estas células sejam fagocitadas por macrófagos. As caspases atuam interagindo com receptores na membrana das células (receptores de morte celular) ou moléculas adaptadoras no citoplasma através de regiões específicas chamadas de domínio de morte (revisado por BOATRIGT & SALVENSEN, 2003).

As caspases humanas sub-divididas em três grandes grupos: caspases ativadoras da cascata de apoptose (caspase -2, -4, -8, -9, -10 e -12), caspases executoras (caspases -3, -6 e -7) (figura 4) e outras, como -1, -5 e -11, envolvidas na maturação de citocinas, mas sua participação na apoptose não é totalmente descartada (revisado por DENAULT & SALVESEN, 2002; revisado por DEGTEREV & YUAN, 2008).

Posteriormente, descobriu-se que genes homólogos aos estudados em *C. elegans* atuam em humanos, indicando que este seja um mecanismo conservado de vermes até mamíferos, como a proteína Bax se associando ao gene *Bcl-2* induzindo a liberação da proteína fator ativador de apoptose (APAF-1), ativando a caspase 9, e assim induzindo a apoptose (revisado por STELLER, 1995; revisado por YUAN, 1996; HISAHARA *et al.*, 1998; revisado por HENGARTNER, 2000).

A família de proteínas BCL-2 atua regulando a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria. Eles podem atuar de forma pró (BAX, BAD, BAK e outros) ou anti-apoptótica (BCL-2, BCL-xL, BCL-W e outros) (revisado por YOULE & STRASSER, 2008).

O mecanismo de inibição da apoptose por essas proteínas consiste em inibir a permeabilidade da membrana externa mitocôndria, prevenindo a liberação dos componentes para o citosol, como o citocromo c. As moléculas inibidoras de apoptose (BCL-2, BCL-xL, BCL-W, outras) podem interagir diretamente com BAK e BAX e inibindo a sua oligomerização (revisado por YOULE & STRASSER, 2008).

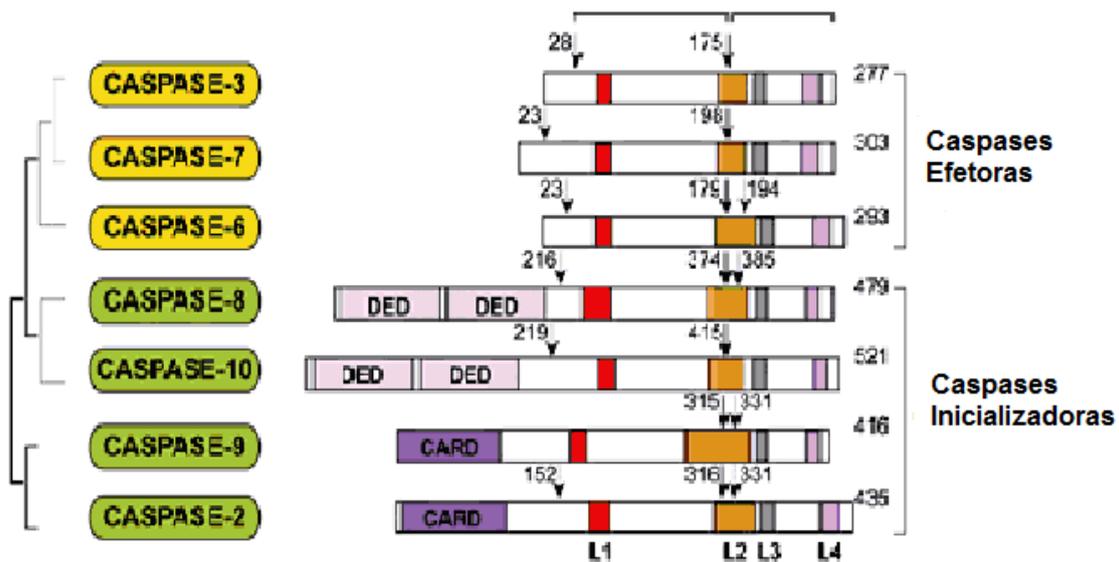


Figura 4: Esquema estrutural de caspases participantes da apoptose (adaptado de PETRONELLI *et al.*, 2005).

As vias de ativação de apoptose são divididas em dois grandes grupos devido à origem do sinal indutor de morte: Via Extrínseca e a Via Intrínseca. A via extrínseca é inicializada pela ativação dos chamados receptores de morte, os quais apresentam em sua porção intracelular um domínio de morte, como os receptores da grande família de receptores de fator de necrose tumoral (TNFR-

1, Fas/CD95 e TRAIL) (revisado por ASHKENAZI, 2002). Esses receptores, quando ativados, sofrem uma trimerização e consequente ativação de suas porções intracelulares, contendo o chamado domínio de morte, as quais recrutam a caspase-8, por meio de moléculas adaptadoras (FADD ou TRADD), iniciando a cascata de caspases que culminam na ativação da caspase-3 e esta executa a morte celular em células tipo 1 (figura 5) (SCAFFIDI *et al.*, 1998; revisado por NAISMITH & SPRANG, 1998).

A classificação das células em tipo 1 e 2, foi determinada por SCAFFIDI e cols. (1998) e é determinada pelo tempo que cada célula necessita para ativar as caspases -8 e -3 mediante um estímulo apoptótico. As células tipo 1 são mais rápidas do que as células tipo 2, pois estas realizam uma etapa intermediária, na mitocôndria, a fim de amplificar o sinal de morte.

Os receptores de morte em células tipo 2 não conseguem gerar um sinal de apoptose forte o suficiente para ativar o processo de morte. A amplificação do sinal ocorre em vias apoptóticas na mitocôndria, através dos membros da família Bcl-2, principalmente a molécula Bid que faz a ponte entre as caspases e a mitocôndria. O Bid é clivado pela caspase-8 (LI *et al.*, 1998; BOSSY-WETZEL & GREEN, 1999) e depois é translocado para a mitocôndria, aonde age em conjunto com Bax e Bak, promovendo a liberação do citocromo c e outros fatores pro apoptóticos para o citosol (figura 5) (LUO *et al.*, 1998; GROSS *et al.*, 1999). O citocromo c no citosol liga-se a Apaf-1, e de maneira dependente de ATP, oligomerizam-se para formar o apoptossomo que ativa a pró-caspase-9 (ACEHAN *et al.*, 2002). A caspase-9 ativada inicia a cascata das caspases chegando até as caspases efetoras (3, 7 e 6), resultando na morte da célula (SLEE *et al.*, 1999).

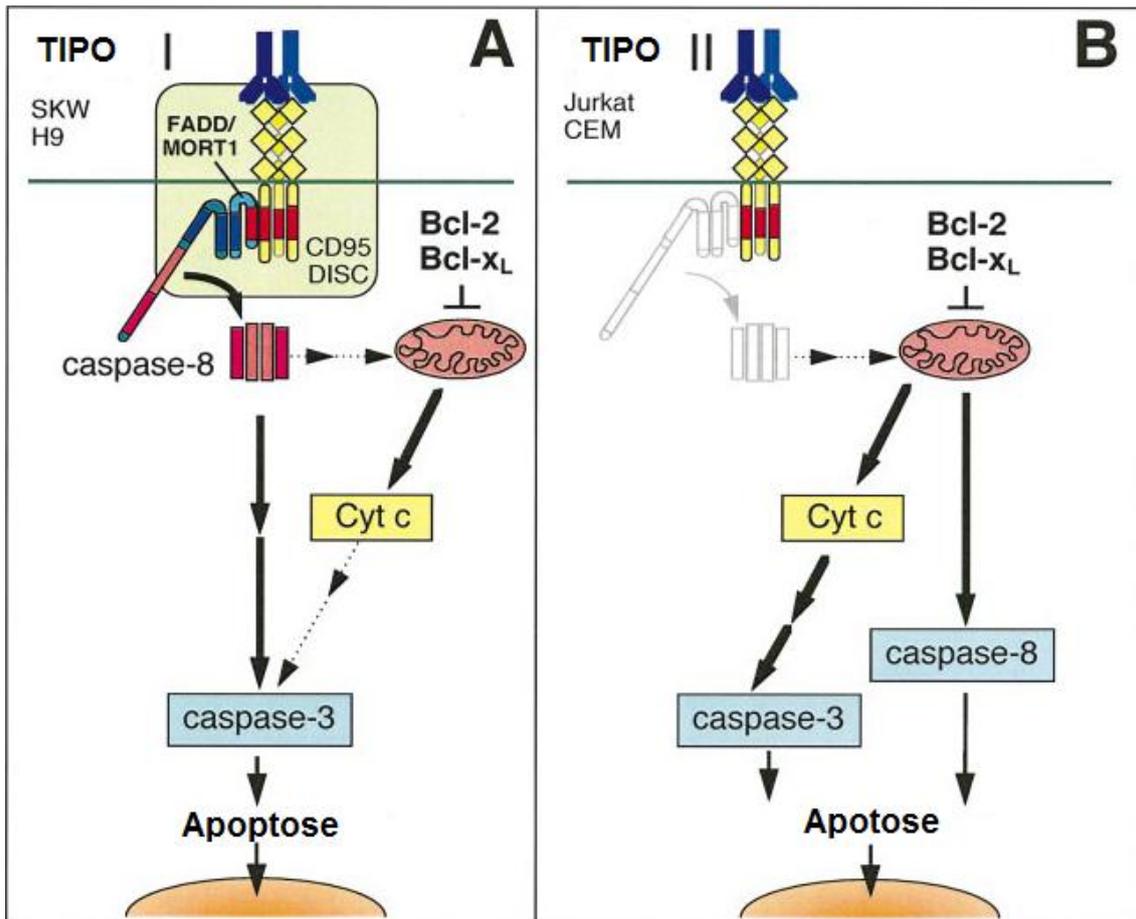


Figura 5: Esquema apresentando as diferenças entre a via extrínseca em células tipo 1 e tipo 2 (modificado de SCAFFIDI *et al.*, 1998).

A via intrínseca pode ser ativada por mecanismos de estresse intracelular ou extracelular, como por exemplo, privação de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia, ativação de oncogenes, entre outros, convergindo para a mitocôndria (revisado por HENGARTNER, 2000; revisado por KAUFMANN & EARNSHAW, 2000; revisado por WANG, 2001).

Os mecanismos apoptóticos, em sua maioria, afetam a membrana interna da mitocôndria, aumentando a sua permeabilidade e acabando com o potencial transmembrana (revisado por DESAGHER & MARTINO, 2000; revisado por GEWIS, 2003). O rompimento da membrana mitocondrial é sucedido pela liberação de proteínas pró-apoptóticas no citoplasma (revisado por BERNARDI *et al.*, 1999; revisado por LOEFFLER & KROEMER, 2000).

Entre essas proteínas está o citocromo c, que ativa o apoptossomo e a cascata de caspases, mas também o fator indutor de apoptose (AIF), a endonuclease endoG, Smac/Diablo e Htr/Omi (SUSIN *et al.*, 1999; VERHAGEN *et al.*, 2000; VERHAGEN *et al.*, 2002).

A liberação do conteúdo mitocondrial no citoplasma afeta a homeostasia da célula, parando a produção de ATP, oxidando moléculas-chaves do processo redox da célula (NADH, NADPH e glutatona) e ocorrendo assim um aumento na formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) (revisado por KROEMER, ZAMZAMI & SUSIN, 1997; revisado por KROEMER & REED, 2000). O aumento dos níveis de ROS causa a oxidação de lipídeos e ácidos nucléicos, afetando ainda mais o potencial de membrana mitocondrial (fig. 6) (MARCHETTI *et al.*, 1997).

O mecanismo efetor para a formação do poro de transição na membrana mitocondrial mais aceita, diz que ele é composto, principalmente, por translocador de nucleotídeos adenina (ANT) e um canal de ânions voltagem-dependente (VDAC) (BAUER *et al.*, 1999; BEUTNER *et al.*, 1998). O complexo VDAC-ANT liga as membranas interna e externa da mitocôndria, permitindo a formação do poro de transição (BEUTNER *et al.*, 1998).

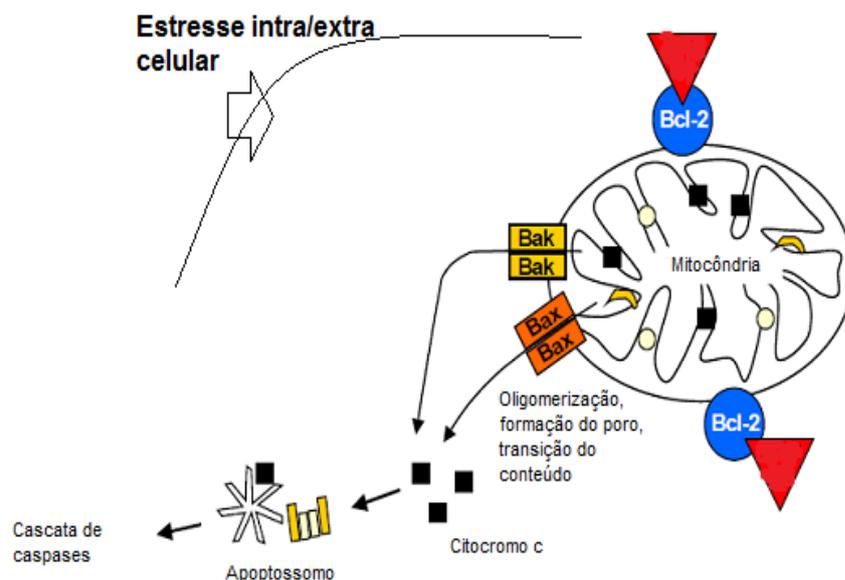


Figura 6: Esquema da via intrínseca de apoptose (adaptado por GEWIS, 2003).

1.2.1.2- Necrose

Uma definição clássica da necrose baseia-se em critérios morfológicos, considerando o ganho de volume da célula, dilatação das organelas citoplasmáticas, principalmente a mitocôndria, e a posterior ruptura da membrana plasmática, resultando na liberação do conteúdo celular (revisado por KROEMER *et al.*, 1995; revisado por FULDA *et al.*, 2010). Em condições extremas, como estresse por detergente ou congelamento, as células morrem de maneira não controlada, a necrose clássica (revisado por GOLDSTEIN & KROEMER, 2007).

Contudo, várias evidências demonstram que a necrose pode apresentar uma regulação, utilizando vias transdutoras de sinal e mecanismos enzimáticos (VERCAMEN *et al.*, 1998 A; VERCAMEN *et al.*, 1998 B; FESTJENS *et al.*, 2006; HITOMI *et al.*, 2008).

Além disso, já foi demonstrado que receptores de morte celular (TNFR1, Fas/CD95 e TRAIL-R) e TLRs (TLR3 e TLR4) induzem a morte celular por necrose. Esse processo ocorre na presença de inibidores de caspase e dependente de sinalização via RIP1 (HOLLER *et al.*, 2000), demonstrado pelo uso de células deficientes e por inibição farmacológica dessa molécula (fig. 7) (revisado por HENGARTNER, 2000; KALAI *et al.*, 2002; DEGTEREV *et al.*, 2005; DEGTEREV *et al.*, 2008).

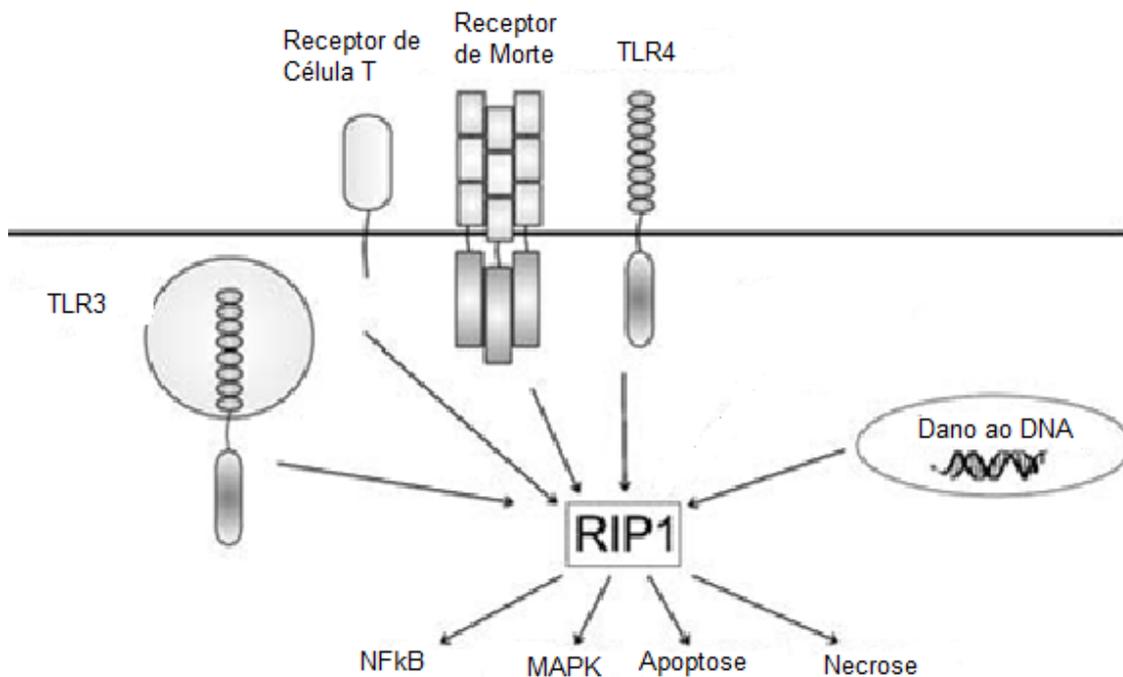


Figura 7: Papel central da molécula de RIP1 na decisão de vida ou morte de células expostas a sinais de estresse e sua participação na via de sinalização de NFkB e MAPKs. A sinalização iniciada por TCR, receptores de morte, TLR-4, TLR-3 converge para RIP1. (modificado de FESTJENS *et al.*, 2007).

1.2.1.2.1- Necroptose: A necrose regulada

A sinalização de morte celular por apoptose é bem conhecida e pode ser revertida, inibindo as caspases (LAVRIK, GOLKS & KRAMMER, 2005). Entretanto, VERCAMMEN *et al.* (1998 A) demonstraram que a inibição de caspases sensibiliza fibroblastos e linhagens tumorais aos efeitos citotóxicos do TNF. Esse trabalho indicou que outros processos de morte celular, medeiam a citotoxicidade do TNF quando a apoptose estiver inibida (VERCAMMEN *et al.*, 1998 B; KAWAHARA *et al.*, 1998; HOLLER *et al.*, 2000; DEGTEREV *et al.*, 2005; HITOMI *et al.*, 2008).

CAUWELS *et al.* (2003) demonstraram, *in vivo*, que o tratamento associado de TNF e Z-VAD-fmk (inibidor geral de caspases) induz a morte de camundongos em um tempo menor (4 horas) do que os animais tratados

apenas com TNF (24 horas). O uso de antioxidantes bloqueou esse processo, indicando que a produção de espécies reativas deve estar envolvida nesse processo de morte. Já HITOMI et al (2008) descreveram as vias moleculares que o TNF utiliza para induzir a necroptose em células.

A Necroptose é um processo morte celular regulada, não apoptótico que apresenta uma morfologia necrótica e que pode ser induzida pela ativação de receptores de morte, depende da atividade quinase de RIP1 e de uma inibição das vias apoptóticas (revisado por YU, LEONARDO & BAEHRECKE, 2004; revisado por DEGTEREV & YUAN, 2008; HITOMI *et al.*, 2008).

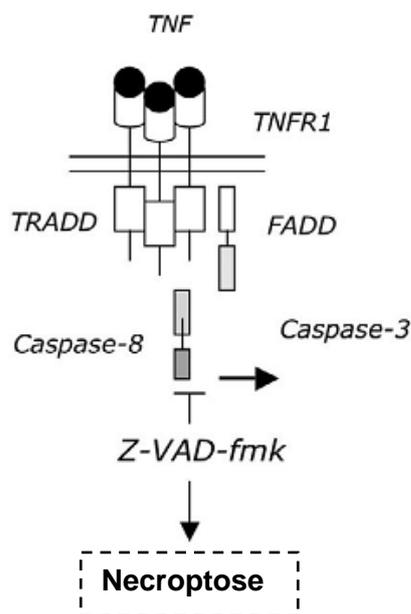


Figura 8: Esquema do mecanismo de indução de necroptose por TNF via TNFR-1, quando a apoptose está inibida por Z-VAD-fmk. (Adaptado de ENS *et al.*, 2006).

A família das proteínas RIP é composta por sete membros e todos apresentam um domínio quinase. Pertence à família das serina/treonina quinases e são evolutivamente relacionadas à família das quinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK) (revisado por MEYLAN & TSCHOPP, 2005).

O RIP1 é uma molécula adaptadora intracelular com atividade quinase, que participa do recrutamento do complexo quinase de I κ B ao receptor de TNF permitindo a ativação de NF κ B (MICHEAU & TSCHOPP, 2003; SCHNEIDER-BRACHERT *et al.*, 2004, revisado por MEYLAN & TSCHOPP, 2005). A função quinase dessa molécula é fundamental para a necroptose, pois, células que não possuem RIP1 ou apresentam a função quinase de RIP1 inibida são resistentes á necroptose iniciada por TNF ou CD95 (KELLIHER *et al.*, 1998; HOLLER *et al.*, 2000; DEGTEREV *et al.*, 2008). Já a sua participação na sinalização de NF κ B induzida por TNFR1 parece independe da sua atividade quinase (WONG *et al.*, 2010).

As espécies reativas de oxigênio também são importantes na sinalização da necroptose e elas atuam posteriormente a RIP1, na via de sinalização (LIN *et al.*, 2004; SHEN *et al.*, 2004; revisado por MEYLAN & TSCHOPP, 2005). Contudo, ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo utilizado pelo RIP para induzir o ROS intracelular. O trabalho de TEMKIN *et al.*, (2006) demonstrou que a molécula de RIP1 atua inibindo a translocação de ADP citosólico para a mitocôndria, resultando em baixa de ATP intracelular e produção de ROS, culminando na morte celular necrótica. Além disso, LIN *et al.*, (2004) demonstraram que o TNF exógeno não é capaz de induzir geração de ROS em células RIP1 deficientes.

1.3- TNF/TNFR

O TNF foi inicialmente identificado com um fator capaz de induzir a morte de células tumorais *in vitro* e causar necrose hemorrágica em tumores transplantados (CARSWELL *et al.*, 1975; PENNICA *et al.*, 1985). Ele possui um papel crucial e várias desordens inflamatórias, induzindo a secreção de outras citocinas, expressão de moléculas de adesão, indução de morte celular programada, atividade antiviral e ativação da via de NF κ B (revisado por SHEN & PERVAIZ, 2006). Ele é expresso como uma proteína trimérica transmembranar tipo 2, que pode ser clivada (forma solúvel) pela enzima conversora de TNF ou manter-se ligado a membrana celular (forma

membranar) (BLACK *et al.*, 1997; revisado por TANG, HUNG & KLOSTERGAARD, 1996).

Ele sinaliza por dois receptores de alta afinidade, TNFR1 (p55) e TNFR2 (p75), ativando as via de NF κ B e a MAPK (LEE *et al.*, 2003). Entretanto, apenas o TNFR1 é considerado um receptor de morte canônico, pois o TNFR2 não possui um domínio de morte intracelular (revisado por LOCKSLEY, KILLEEN & LENARDO, 2001).

Os membros da família dos receptores de TNF são proteínas transmembrana tipo 1, que apesar da sua baixa homologia (20 a 25%), são agrupadas devido à presença de resíduos conservados de cisteína no seu domínio de ligação externo (revisado por GUICCIARDI & GORES, 2009). Esses receptores podem ser encontrados ligados à membrana citoplasmática ou na forma solúvel (TARTAGLIA & GOEDDEL, 1992). Os receptores agregados a membrana citoplasmática são caracterizados pela disposição em trímeros ou complexos multiméricos, e estabilizados por pontes de sulfeto formadas entre moléculas de cisteínas (BANNER *et al.*, 1993), enquanto que a forma solúvel é gerada por clivagem proteolítica (TNFR1, TNFR2, CD27, CD30, CD40 e Fas) ou *splicing* alternativo (4-1BB) (revisado por GRUSS e DOWER, 1995).

Em 1993, foi criado o termo “domínio de morte” para designar uma sequência de 80 aminoácidos localizada na região intracelular do receptor TNF-R1 (p55). Esta sequência foi identificada, por meio de estudos de mutagênese, como a responsável pela sinalização de morte celular apoptótica em respostas antivirais (TARTAGLIA *et al.*, 1993).

As moléculas de TNF e TNFR1 participam de mecanismos de morte celular, recrutando moléculas indutoras de morte (TARTAGLIA *et al.*, 1991; SCHNEIDER-BRACHERT *et al.*, 2004). A ligação do TNF ao TNFR1 resulta na trimerização deste e no recrutamento de TRADD (HSU *et al.*, 1995), a qual recruta FADD, TRAF2 e RIP1. FADD conecta o complexo TNFR1-TRADD à ativação da caspase-8, iniciando a apoptose.

TRADD, FADD e caspase-8 estão envolvidos na indução de apoptose, enquanto que a molécula de RIP1 é associada à morte com características

necróticas induzida pelo eixo TNF-TNFR1 (revisado por WAJANT, PFIZENMAIER & SCHEURICH, 2003).

1.4- Heme e morte celular

O acúmulo de heme/hemoproteínas no plasma e/ou tecidos pode ocasionar a morte de células (revisado por GOZZELINO *et al.*, 2010). O heme pode sensibilizar hepatócitos para os efeitos citotóxicos do TNF (SEIXAS *et al.*, 2009) e durante um evento de sepse grave pode contribuir para a falência de órgãos, característica dessa doença (revisado por GOZZELINO *et al.*, 2010).

Além disso, o heme e outras metaloporfirinas são capazes de induzir a morte celular de células normais ou tumorais (CHOW *et al.*, 2008), *in vitro*, por um mecanismo de morte denominado necroptose (LAIRD *et al.*, 2008). Nesse processo de morte induzida por heme à participação de espécies reativas de oxigênio parece ser bastante relevante, também foram demonstradas a participação de vias de MAPK (JNK e ERK), proteção pela indução de HO-1 e a inibição do processo com o uso de necrostatina-1 (inibidor de RIP1) (LAIRD *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2009; BALLA *et al.*, 1991 A; BALLA *et al.*, 2000).

O heme livre também 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 (ARRUDA *et al.*, 2004). LANG *et al.*, (2004) demonstraram que o heme inibe a apoptose de monócitos humanos *in vitro*, e que é capaz de induzir a diferenciação destes em macrófagos. Estes dados sugerem que o heme pode contribuir para o desenvolvimento de inflamação associada a episódios hemolíticos, retardando a apoptose de neutrófilos, e inibindo a morte e ativando macrófagos afetando a homeostasia do processo inflamatório.

Contudo, os mecanismos moleculares e as condições necessárias para o efeito citotóxico ou citoprotetor do heme requerem investigações mais aprofundadas. A indução de morte ou inibição da mesma em células do sistema imune inato poderia estar interferindo no estabelecimento e resolução

da resposta imunológica em patologias hemolíticas, possivelmente participando da imunopatologia associada a essas doenças.

2- HIPÓTESE

A molécula de heme induz morte celular, por meio de sua atividade oxidante e capacidade de induzir TNF.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar o efeito citotóxico do heme sobre macrófagos e neutrófilos e o mecanismo de morte envolvido nesse fenômeno.

3.2- Objetivos Específicos

A) Caracterizar o efeito citotóxico do heme em macrófagos e neutrófilos:

- 1) Avaliar o efeito da presença de soro nesse processo.
- 2) Investigar a importância da geração de ROS pelo heme para seu efeito tóxico.

B) Avaliar possíveis mecanismos de sinalização do heme na morte celular:

- 1) Investigar o papel da sinalização (via TLR4 e TNF) induzida pelo heme na indução de morte celular.
- 2) Inferir a participação do receptor de TNF tipo 1 nesse processo de morte.
- 3) Avaliar a participação da atividade quinase de RIP1 no mecanismo de morte e a capacidade de Necrostatina-1 em inibir esse processo.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Animais

Os camundongos C57BL/6, machos ou fêmeas, com idades entre 4 a 6 semanas foram fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os animais deficientes (TNFR-1 e TLR-4), ambos em “background” C57/BL6. Esses animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia do IMPPG a temperatura constante (25°C) e com ciclos de 12 horas de claro/escuro. Os animais TNFR-1 foram gentilmente cedidos pela Dra. Patrícia Bozza, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica.

4.2- Reagentes

Heme foi obtido comercialmente da empresa Frontier Scientific. Nos experimentos essa porfirina, imediatamente antes do uso, foi dissolvida em NaOH 0,1 N (estéril), diluída em RPMI-1640 puro (concentração estoque de 5mM) e filtrada. A solução estoque foi mantida protegida da luz. Os controles durante os experimentos consistiram na adição de uma solução de NaOH (Sigma-Aldrich) 0,1 N.

O LPS O111: B4 (5 mg/mL) foi obtido da Invivogen, armazenado a -20°C e diluído em meio RPMI-1640 imediatamente antes do uso. A Polimixina B (15µg/mL em cada poço) (Cambrex) e a N-acetilcisteína (NAC) obtida da Sigma e diluído em RPMI-1640 imediatamente antes do uso (300 mM). Adenosina trifosfato (ATP) foi obtido da Sigma e estocado a -20°C (90 mM). O meio RPMI-1640, o Tween 20 e a Tripsina 0,25% 1:250/EDTA foram obtidos da LGC Biotecnologia. O soro fetal bovino (SBF) foi obtido da Invitrogen.

O reagente para a quantificação de TNF (Kit de Elisa) e o TNF recombinante (TNFr) usado em cultura foram obtidos da Peptotech. O 5-(and -6)-chloromethyl-2´7´- dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CMH2DCFDA) foi obtido da Molecular probe. Os reagentes de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (0,5 mg/mL, diluído

em BSS imediatamente antes do uso) e o Azul de Trypan (0,8% peso/volume) foram comprados da Sigma. O kit de dosagem de desidrogenase láctica (LDH) foi obtido da empresa DOLES. A Necrostatina-1 foi obtida da Enzo Life Sciences e diluída (10 mM) em DMSO e estocada a -20°C.

4.3- Obtenção e estimulação de macrófagos peritoneais: Cultura de macrófagos

Os macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal, com meio RPMI gelado, após 4 dias da injeção intraperitoneal de 2 mL de Tioglicolato 3% (Sigma). Nos experimentos de viabilidade, 2×10^5 ou 5×10^5 células foram semeadas em placa de 96 ou 24 poços (TPP) em RPMI 10% de SFB e incubadas durante duas horas a 37°C e 5% de CO₂. Nos experimentos de análise de produção de espécies reativas de oxigênio foram plaqueadas 10^6 por poço e incubadas nas mesmas condições anteriores. Após esse tempo os poços foram lavados para retirar as células não aderentes e meio com soro novo foi adicionado aos poços. As placas foram novamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 16 horas. Após esse período as células não aderentes foram removidas por lavagem e as células aderentes estimuladas em meio na presença ou ausência de soro, conforme o experimento. Os pré-tratamentos com Nac (10mM) e Nec-1(doses indicadas nas figuras) foram realizados 30 e 15 minutos, respectivamente, antes da estimulação com heme.

4.4- Purificação e estimulação de Neutrófilos Humanos

Os neutrófilos foram coletados do sangue periférico de voluntários humanos saudáveis em seringas heparinizadas. O sangue foi diluído 2X em solução salina de Hanks (SIGMA), adicionado lentamente sobre um gradiente de Ficoll (SIGMA.) (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% SFB. A viabilidade dos neutrófilos antes dos experimentos foi avaliada através do ensaio de exclusão com azul de trypan. Após a purificação os neutrófilos foram incubados, 2×10^5 células em eppendorff (1,5 mL), e estimulados como indicado nas figuras. O pré-tratamento com Nec-1 (50 μ M) 15 minutos antes da estimulação com heme (30 μ M) por um tempo de 4 horas.

4.5- Experimentos de Viabilidade celular

Os macrófagos murinos obtidos no lavado peritoneal foram semeados em placas de 96 poços e estimulados na presença ou ausência de soro, em diferentes tempos. Após esse período de estimulação a viabilidade celular foi aferida por meio das técnicas de Azul de Trypan, MTT e LDH.

4.5.1- Azul de Trypan

Nos experimentos de viabilidade, 5×10^5 células foram semeadas em placa de 24 poços em RPMI 10% de SFB e incubadas durante duas horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este tempo as células não aderentes foram removidas por lavagem (3x) e as células aderentes estimuladas na presença ou ausência de soro, conforme o experimento. Após a estimulação, o sobrenadante foi retirado, os poços foram lavados com meio RPMI e foi adicionada a solução de tripsina 0,25% (1X) 1:250/EDTA. Seguiu-se uma incubação de 5 minutos a 37°C e 5% CO₂, retirando-se as células para contagem. O homogenado de células foi diluído em uma solução de azul de trypan 0,8% (50%/50% v/v). As células foram contadas em microscópio (Hund Wetzlar) com o auxílio de um hemocítmetro, aumento de 40x, considerando viáveis apenas as células que não estavam coradas pelo trypan.

4.5.2- Ensaio de MTT

Os macrófagos foram obtidos e incubados como descrito anteriormente. Após o período adequado de estimulação foi retirado o sobrenadante das células e adicionados 100 µL de uma solução de 0,5 mg/mL de MTT em BSS estéril pH 7,4. Após 2h de incubação, a solução é retirada, e os cristais dissolvidos em solução de Isopropanol (VETEC) ácido 0,04 M de HCl (REAGEN). Após a dissolução dos cristais foi realizada a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de 570 nm. A porcentagem apresentada nos gráficos de MTT foi obtida mediante a comparação entre os valores obtidos nas amostras e o valor da média dos controles incubados com 10% soro em cada placa, condição ideal de cultivo e considerada como 100% de viabilidade.

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Valor da amostra}}{\text{Média do controle com soro}}$$

4.5.3- Ensaio de LDH

As células (macrófagos murinos e neutrófilos humanos) foram obtidas e incubadas como descrito anteriormente. Após o período adequado de estimulação tiveram parte do sobrenadante das células (25 µL) para realização do ensaio de LDH. O ensaio foi realizado mediante uma adaptação do kit Doles. Inicialmente, misturamos o substrato (100 µL) em placa de 96 poços fundo chato e o alúmen férrico (5 µL) e por fim adicionamos o volume da amostra. Incubou-se a placa por 3 minutos a 37°C 5% CO₂, e após este período acrescentamos a solução de NAD/FMS (difosfopiridino nucleótido + fenazina metosulfato) (5 µL). Após 6 minutos a 37°C foi adicionada a solução estabilizadora (100 µL) e realizada a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de 490 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o extrato total de células não estimuladas, obtido por lise química (solução de Triton 0,9%). A porcentagem apresentada nos gráficos de

LDH foi obtida mediante a comparação entre os valores obtidos pelas amostras de sobrenadante e o valor da média dos valores do extrato total em cada placa.

$\%LDH \text{ liberado}/LDH \text{ total} = \frac{\text{Valor da amostra de sobrenadante}}{\text{Média do extrato total de células}}$

Média do extrato total de células

4.6- Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes não utilizados para os ensaios de MTT e LDH (deidrogenase láctica) foram guardados a -20°C até o seu uso para dosar TNF pela técnica de ELISA.

As concentrações da citocina TNF foram dosadas em duplicata através do método de ELISA. No primeiro dia do ensaio foi adicionada na placa de ELISA a solução de anticorpo de captura (IgG anti-TNF murino, 100x concentrado), diluído em PBS (1x). A placa de Elisa foi incubada “overnight” a temperatura ambiente. Iniciamos o segundo dia lavando a placa (3x com solução de PBS + Tween-20 0,05%), para retirar os anticorpos de captura não aderidos e incubamos a placa com a solução de bloqueio [BSA (SIGMA) 1% em PBS 1x] por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período foram realizadas mais 3 lavagens dos poços e adicionaram-se as amostras e a curva padrão (0 até 2 ng/mL) utilizando citocina recombinante, seguindo as recomendações do kit. A placa foi incubada overnight a 4°C. O terceiro dia iniciou-se com a lavagem da placa (3x) e incubação com o anticorpo de detecção (IgG anti TNF murino 200x concentrado, diluído em PBS/BSA 0,1 %) por 2 horas à temperatura ambiente. Seguiu-se uma nova etapa de lavagem (3x) e a adição de uma solução de Avidina-biotina (6000x). Após 30 minutos realizamos mais 4 lavagens e adicionamos 100 µL da solução de revelação (OPD diluído em Tampão Citrato-Fosfato; 4 mg/10 mL de solução). Aproximadamente, após 15 minutos (observamos mudança de cor nos poços) e adicionamos 100 µL da solução de parada [HCl 1M (REAGEN)] e foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro no comprimento de 490 nm.

4.7- Ensaio de geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

As culturas de macrófagos elicitados com tioglicolato foram realizadas como descrito anteriormente. As células aderentes foram estimuladas por 1 hora à 37°C com diferentes estímulos, segundo indicado nas legendas das figuras. Após este tempo as células foram lavadas e incubadas por 30 minutos à 37°C com 2 µL de CM-H2DCFDA diluído em RPMI-1640 na ausência de soro. 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 espécies reativas de oxigênio. Essa fluorescência (geração de ROS intracelular) foi analisada por citometria de fluxo, utilizando o FACSCan (BD Biosciences). Os resultados foram analisados pelo software WinMDI versão 2.8, sendo avaliada a porcentagem de células positivamente marcadas com a sonda.

4.8- Método para análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism 5*, utilizando o Teste t de Student. Os dados são representados como média ± EPM e são considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

5- RESULTADOS

5.1- Heme induz a morte de macrófagos de maneira tempo e concentração dependente.

Diversos estudos demonstraram que o heme é uma molécula citotóxica (JENEY *et al.*, 2002; GONZALEZ-MICHACA *et al.*, 2004; LAIRD *et al.*, 2008; CHOW *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2009). Inicialmente avaliamos o efeito do heme na viabilidade de macrófagos ao longo de 6h de estímulo utilizando tanto a conversão de MTT quanto a liberação de LDH. O efeito citotóxico do heme ocorreu de maneira concentração dependente a partir de 30 μ M, sendo observada uma redução de 50% na viabilidade celular (Fig. 9 A, B).

A análise da cinética deste efeito demonstrou que o tratamento com heme na concentração de 30 μ M gerou uma redução significativa da viabilidade de macrófagos observada a partir de 4h (Fig. 10 A, B).

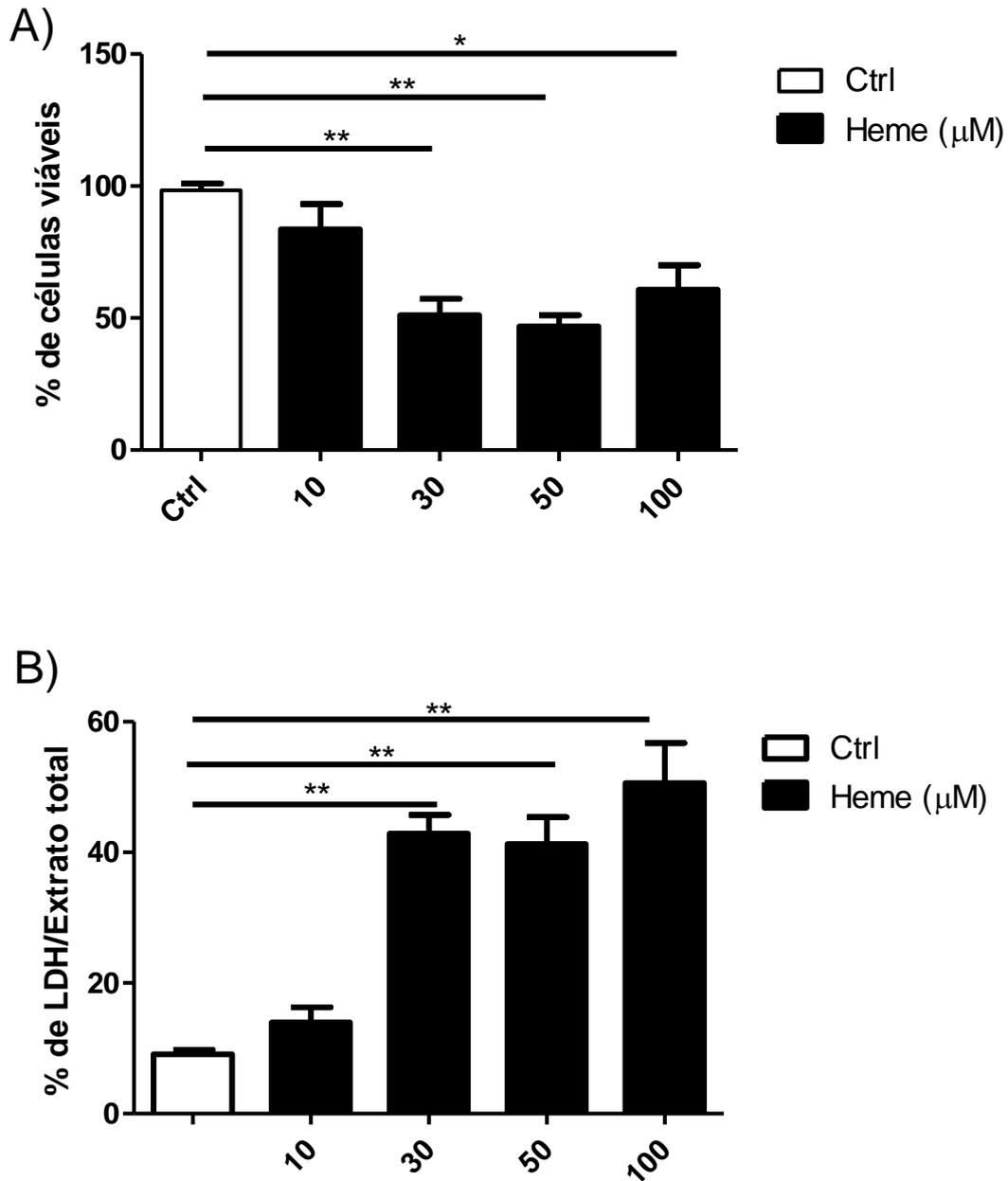


Fig. 9: Avaliação do fenômeno de morte celular utilizando uma concentração-resposta de heme. Foram utilizadas as seguintes concentrações de heme: 10, 30, 50 e 100 μM , na ausência de SFB, durante 6 horas de estimulação. A) O resultado de MTT apresentado está na forma de porcentagem de viabilidade em referência ao controle, considerado como 100% de viabilidade. B) Já o resultado de detecção de LDH foi expresso na forma de % de LDH liberado/LDH total. Figura representando a média de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$

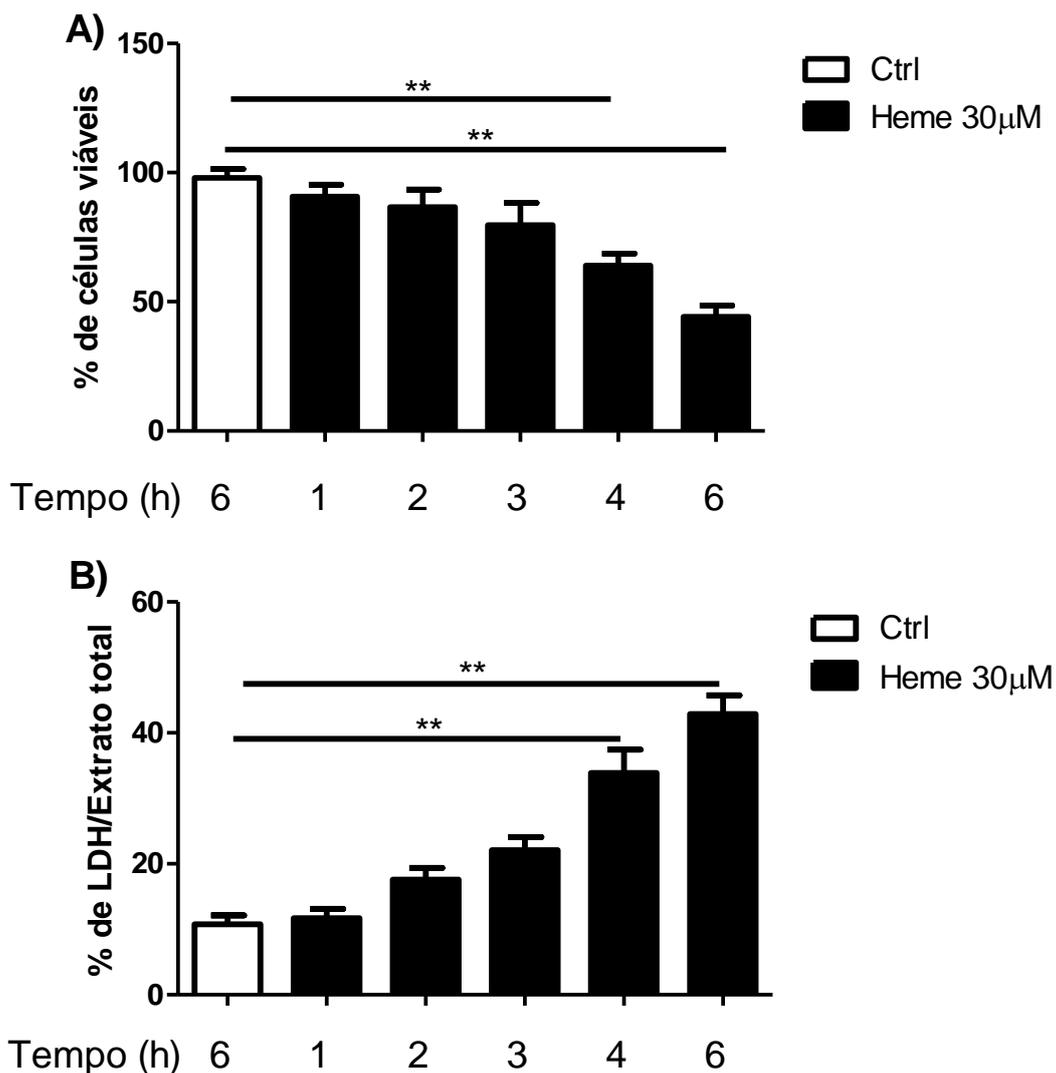


Fig. 10: Cinética de morte celular induzida pelo heme. Foi utilizada a concentração de 30µM de heme para a estimulação dos macrófagos na ausência de SFB durante os tempos indicados na figuras. A) O resultado de MTT apresentado está na forma de porcentagem de viabilidade em referência ao controle, considerado como 100% de viabilidade. B) O resultado de detecção de LDH foi expresso na forma de LDH liberado/LDH total. Figura representando a média de 3 experimentos independentes. ** p<0.01

5.2- A presença de soro fetal inibe o mecanismo citotóxico do heme.

Recentemente, nós demonstramos que o soro inibe a ativação de macrófagos com heme (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Decidimos investigar se a adição de soro afeta o efeito citotóxico do heme. A estimulação de macrófagos com heme provocou uma redução significativa na viabilidade celular apenas na ausência de soro e foi inibida pela presença de 10% de SFB (figura 11 e 12). O ATP (5mM) foi utilizado como controle positivo e provocou a morte celular mesmo na presença de SFB.

Em seguida, avaliamos se a adição de soro após diferentes intervalos da estimulação com heme seria capaz de inibir o efeito citotóxico. A adição de soro, nos tempos de 1h e 2h, conseguiu reverter à perda de viabilidade observada na condição sem soro. Contudo, o mesmo não aconteceu quando a reposição foi realizada após 4h de estimulação com heme (figura 13). Esse resultado sugere que o fenômeno de morte induzido pelo heme ocorre de forma regulada e com um tempo crítico entre 2 e 4 horas. Podemos inferir ainda que este fenômeno de morte requer uma manutenção na condição de heme sem soro durante essa fase crítica.

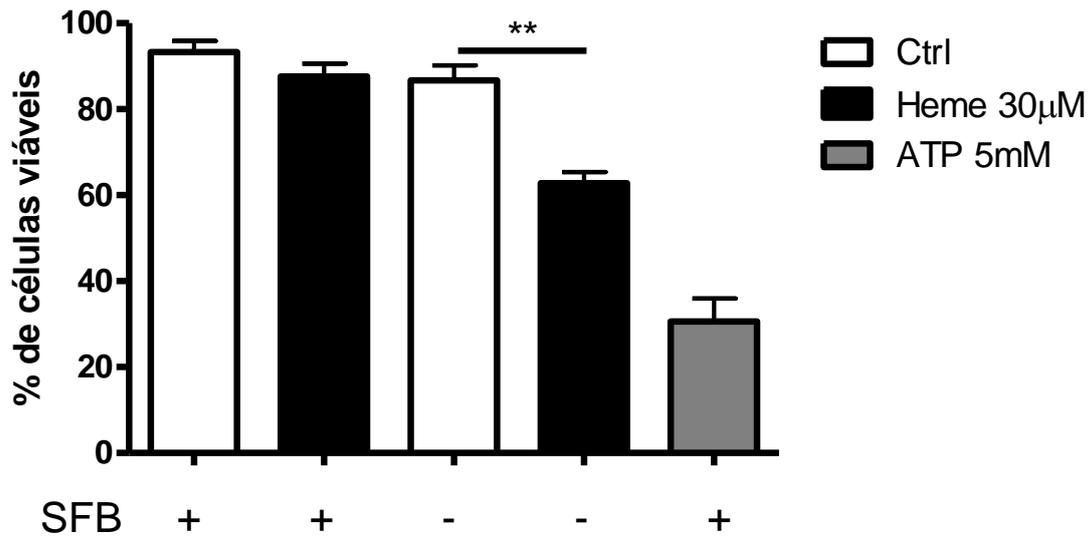


Fig.11: Morte induzida pelo heme avaliada pela metodologia de Trypan. Foi utilizada a concentração de 30μM de heme na presença e na ausência de SFB, durante um tempo de 6 horas de estimulação. O resultado apresentado está na forma de porcentagem de células viáveis. Os macrófagos estimulados com ATP 5mM representam um controle positivo de morte celular induzida durante 1h. Figura representando a média de 3 experimentos independentes.

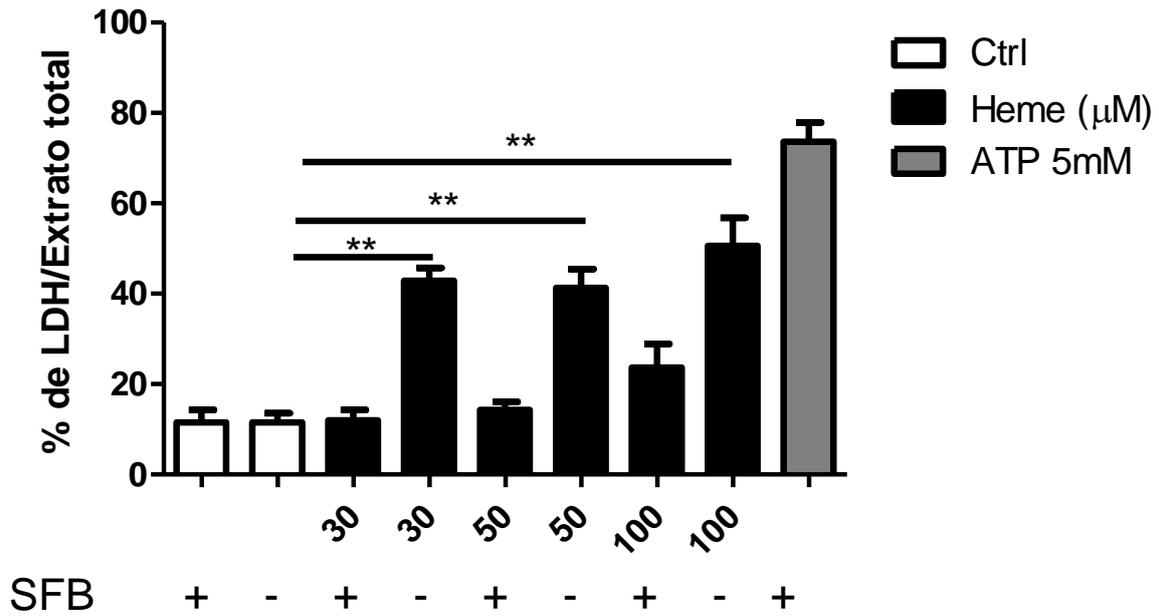


Fig. 12: Efeito protetor do SFB na morte induzida pelo heme. Foram utilizadas as concentrações de 30, 50 e 100 μM de heme na presença e na ausência de SFB, durante um tempo de 6 horas de estimulação. O resultado de detecção de LDH foi expresso na forma de % de LDH liberado/LDH total. Os macrófagos estimulados com ATP 5mM representam um controle positivo de morte celular induzida durante 1h. Figura representando a média de 3 experimentos independentes. ** $p < 0.01$ em relação ao controle sem soro.

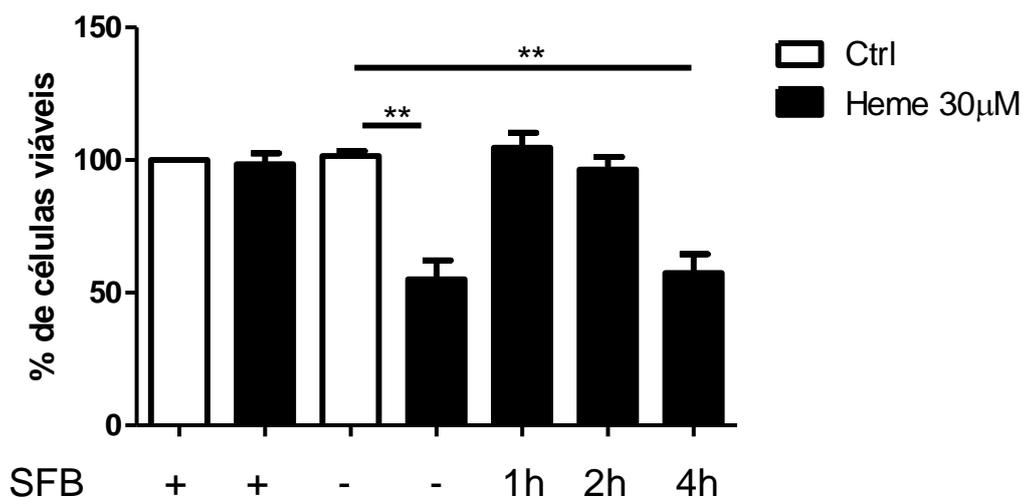


Fig.13: Efeito inibitório da adição de SFB na morte induzida por heme. Os macrófagos elicitados foram incubados com ou sem heme (30 μM) na presença ou ausência de SFB (10%). Realizamos a adição de SFB (10% concentração final no poço) 1, 2 ou 4 horas após a estimulação de macrófagos com heme (30 μM) na ausência de SFB. O experimento apresentou um tempo total de 6 horas após o estímulo de heme. O resultado apresentado está na forma de porcentagem de células viáveis em referência ao controle com soro desde o início do experimento, considerado como 100% de viabilidade. Figura obtida da média de 3 experimentos independentes avaliados por MTT. ** p<0.01 em relação ao controle incubado sem soro.

5.3- Envolvimento do TLR4 no efeito citotóxico do heme.

Anteriormente, nosso grupo mostrou a capacidade do heme em estimular a liberação de TNF de forma TLR4-dependente, apenas na ausência de soro (FIGUEIREDO e col., 2007). Investigamos se o TLR4 seria importante na morte de macrófagos induzida pelo heme. Para tal, comparamos o efeito do heme na viabilidade de macrófagos de camundongos selvagens ou deficientes de TLR4 (*Tlr4*^{-/-}). Os macrófagos de camundongos selvagens estimulados com heme (30 μ M) apresentaram citotoxicidade na ausência de soro fetal, enquanto que os macrófagos obtidos de animais deficientes em TLR4 foram resistentes (fig. 14 A e B). Esse resultado indica que o processo de morte induzido pelo heme é dependente de TLR4, pois a sua ausência inibe a citotoxicidade do heme.

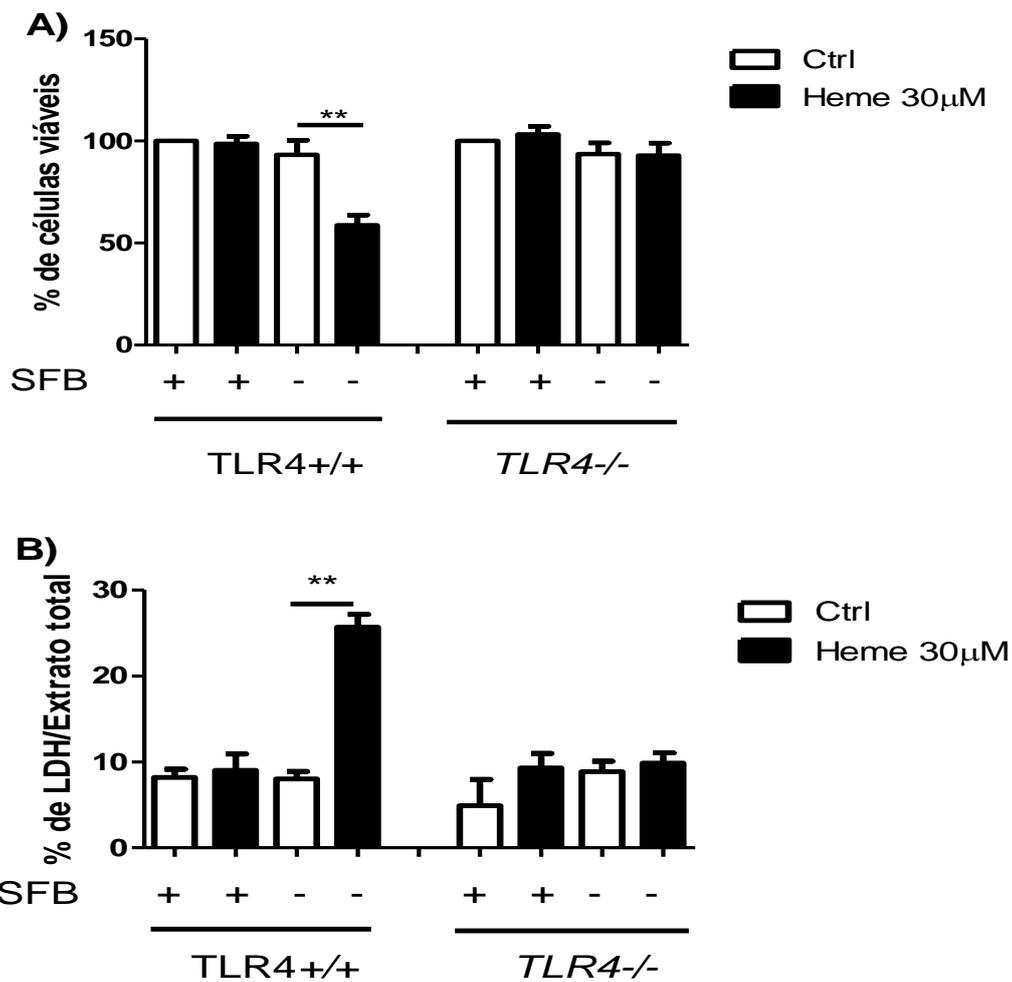


Fig. 14: Resistência de células *TLR4*^{-/-} a morte induzida pelo heme. O experimento apresentou um tempo total de 6h a partir da estimulação com heme 30 μM. A) O resultado de MTT apresentado está na forma de porcentagem de células viáveis em referência ao controle com soro, considerado como 100% de viabilidade. B) O resultado de detecção de LDH foi expresso na forma de LDH liberado/LDH total. Figura obtida da média de 3 experimentos independentes ** p<0.01 em relação ao controle incubado sem soro.

5.4- Envolvimento de TNF no mecanismo de morte celular

Considerando o papel do TLR4 na indução de TNF pelo heme (FIGUEIREDO *et al.*, 2007) e a importante participação desta citocina em processos de morte celular, nós decidimos investigar a participação do TNF na morte de macrófagos induzida pelo heme. Devido à ausência de liberação de TNF em células deficientes de TLR4, adicionamos TNF ao estímulo com heme para investigar a importância desta molécula. Realizamos a estimulação de células deficientes de TLR4 com heme (30 μ M) e TNF recombinante (0,5 ng/mL), na ausência de SFB. Diferente das células incubadas apenas com heme ou apenas com TNF, a estimulação concomitante induziu a morte dos macrófagos, como demonstrado pelo aumento da liberação de LDH (fig. 15). Esses resultados sugerem a necessidade de ambos os estímulos para a indução do efeito citotóxico e indicam que a produção de TNF induzida pela ativação de TLR4 pelo heme é importante para o efeito citotóxico.

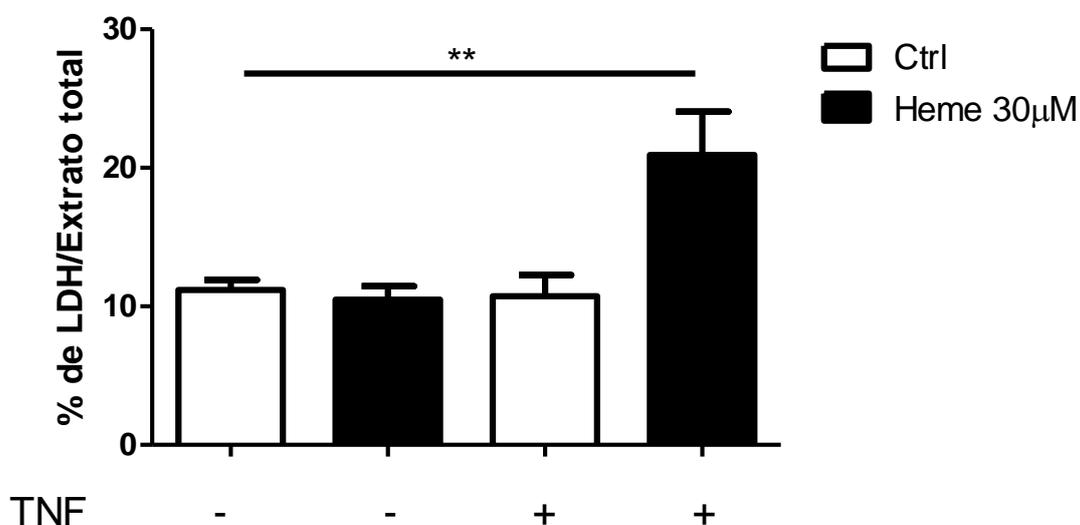


Fig. 15: A resistência de células *TLR4*^{-/-} a morte programada induzida pelo heme é revertida pela adição de TNF. O experimento apresentou um tempo total de 6h a partir da estimulação concomitante de heme 30 μ M e TNF (0,5 ng/mL). Nesse experimento as células foram estimuladas na ausência de SFB. Figura obtida da média de 3 experimentos independentes. ** $p < 0.01$ em relação ao controle não estimulado.

5.4.1- O mecanismo de morte depende da presença de receptor de TNF.

Considerando a importância do TLR4 e do TNF no efeito citotóxico do heme, decidimos investigar o papel do receptor de TNF neste fenômeno. Para tal, utilizamos macrófagos de animais deficientes no receptor tipo 1 de TNF. A comparação com células obtidas de animais selvagens mostrou que os macrófagos deficientes desse receptor são resistentes a morte induzida pelo heme (fig. 16). Em conjunto esses resultados demonstram a importância de um eixo de sinalização, composto pelas moléculas de TLR4-TNF-TNFR1, no mecanismo efetor do fenômeno de citotoxicidade induzido pelo heme.

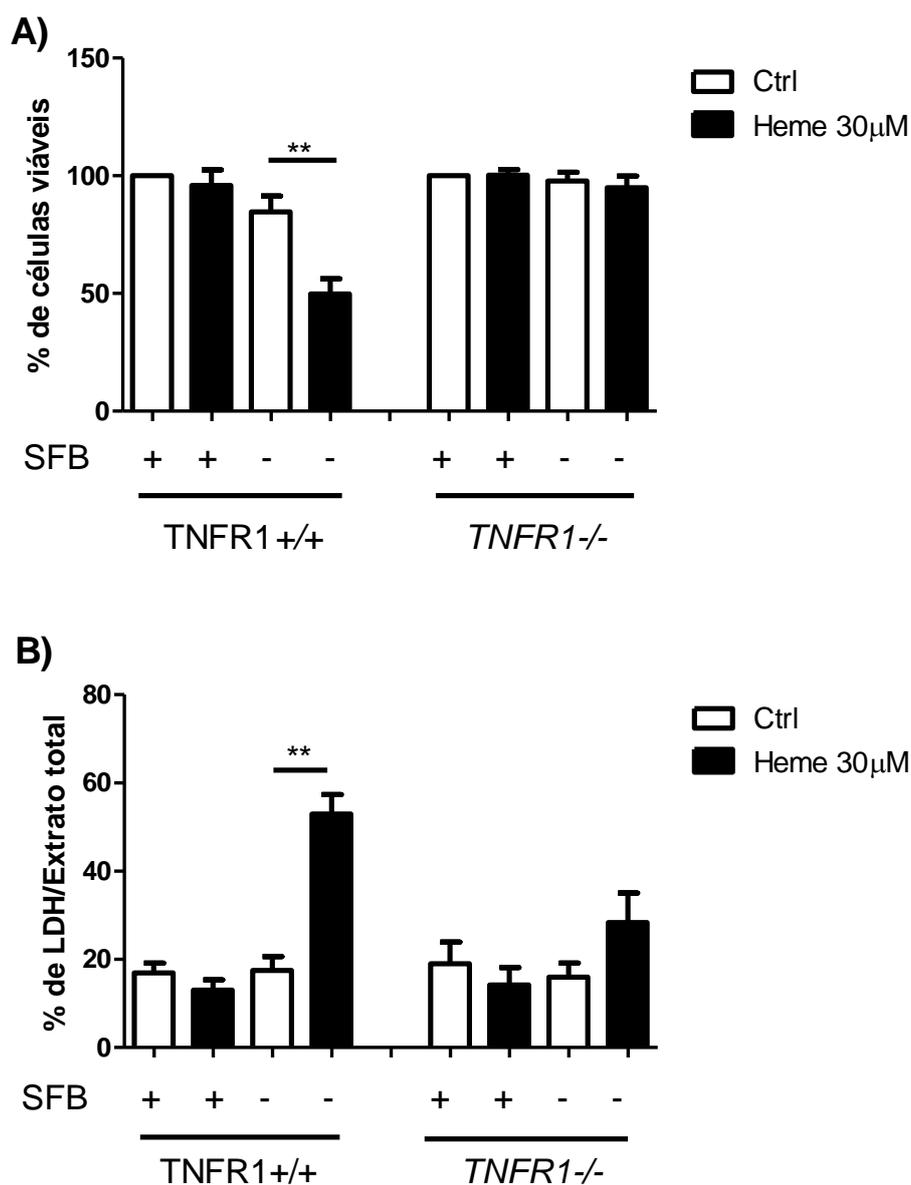


Fig. 16: Resistência de células *TNFR1*^{-/-} a morte induzida pelo heme. O experimento apresentou um tempo total de 6h a partir da estimulação com heme 30 μ M. A) O resultado de viabilidade avaliada por MTT está apresentado na forma de porcentagem de viabilidade em referência ao controle com soro, considerado como 100% de viabilidade. B) O resultado de detecção de LDH é expresso na forma de % de LDH liberado/LDH total. Figura obtida da média de 3 experimentos independentes. ** $p < 0.01$ em relação ao controle incubado sem soro.

5.5- Mecanismo de morte celular dependente da atividade oxidante do heme.

Estudos anteriores demonstraram um importante papel do estresse oxidativo nos efeitos do heme, incluindo seu papel na morte celular e na indução de TNF (CHOW *et al.*, 2008; FERNANDEZ, 2007). Neste sentido, avaliamos o papel pró-oxidante do heme e a participação de espécies reativas de oxigênio como possíveis responsáveis pela redução de viabilidade celular observada anteriormente. Os macrófagos foram pré-incubados por 30 minutos com N-acetil cisteína (Nac) 10 mM, molécula precursora da síntese de glutathiona, que por consequência apresenta um efeito antioxidante e posteriormente adicionamos o heme por um período de 6 horas. O Nac apresentou um efeito protetor significativo contra a morte celular induzida pelo heme (fig. 17). Esse resultado sugere que a indução de ROS pelo heme participa do mecanismo de morte celular.

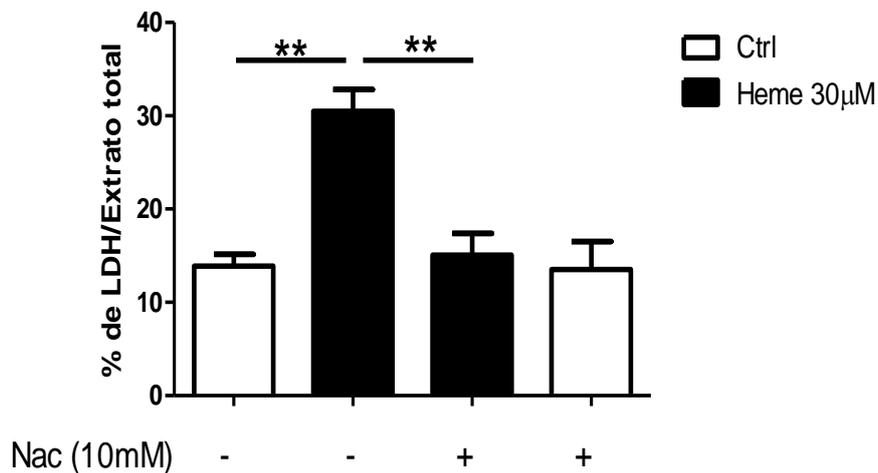
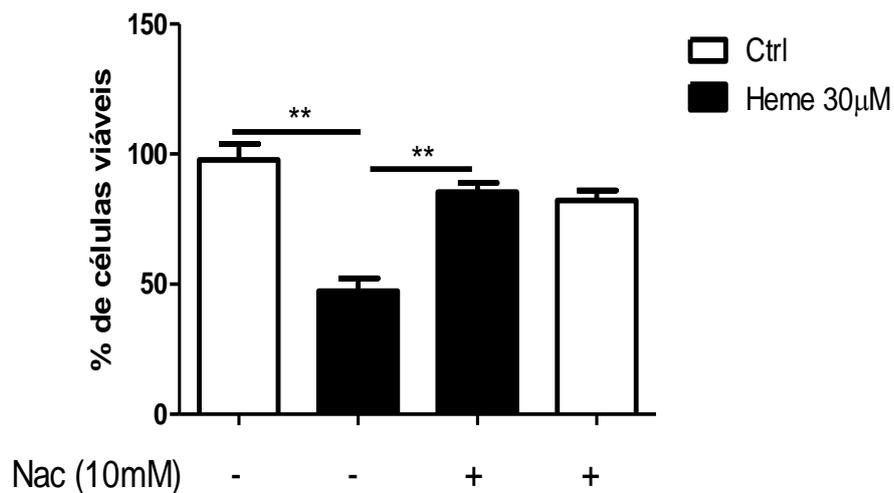


Fig. 17: Efeito de inibidores de espécies reativas na morte induzida por heme. Os macrófagos foram pré-incubados por 30 minutos com N-Acetil cisteína (Nac) 10 mM antes da adição de heme e posteriormente estimuladas por 6h. Nesse experimento foi utilizada a dose de heme 30 µM e todas as amostras apresentadas nas figuras foram estimuladas na ausência de soro. O resultado de MTT apresentado está na forma de porcentagem de viabilidade em referência ao controle com soro (dado não mostrado), considerado como 100% de viabilidade. Já o resultado de detecção de LDH foi expresso na forma de LDH liberado/LDH total. Figura obtida da média de 3 experimentos independentes. ** p<0.01

5.6- Necrostatina-1 (Nec-1) inibe a morte celular induzida pelo heme.

Os resultados anteriores indicam que a morte induzida pelo heme ocorreria por um mecanismo programado, dependente da produção de ROS e TNF. Além disso, LAIRD *et al.*, 2008 demonstrou a capacidade do heme em induzir necroptose em astrócitos. A necroptose é um processo de morte celular programada, não apoptótica, que apresenta uma morfologia necrótica e pode ser induzida por receptores com domínio de morte por meio da atividade quinase de RIP1 (revisado por DEGETEREV e YUAN, 2008). Utilizamos a substância Necrostatina-1 (Nec-1), um inibidor específico da ação quinase de RIP-1 (DEGETEREV *et al.*, 2005; DEGETEREV *et al.*, 2008) para avaliar a capacidade do heme em induzir necroptose neste sistema. Esse tratamento com Nec-1 inibiu de maneira dose-dependente a morte induzida pelo heme (Fig. 18). Este resultado demonstra a participação de RIP-1 na morte induzida pelo heme.

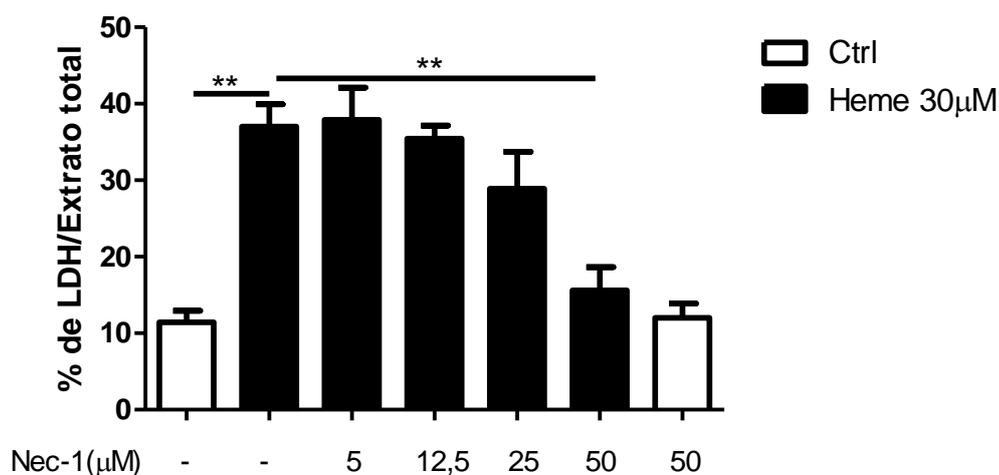


Fig. 18: Efeito inibitório concentração dependente da Nec-1 na morte induzida pelo heme. As células foram pré-incubadas com a Nec-1 (5; 12,5; 25 e 50 µM) 15 minutos antes da estimulação com heme. O experimento apresentou um tempo total de 6h a partir da estimulação com heme e foi realizado na ausência de SFB. O resultado de detecção de LDH foi expresso na forma de LDH liberado/LDH total. Figura obtida da média de 3 experimentos independentes. ** p<0.01

5.6.1- O tratamento com “Nec-1” reduz a produção de TNF induzida pelo heme.

Considerando o papel central do TNF na morte de macrófagos induzida pelo heme, investigamos o efeito da Nec-1 na produção desta citocina pelo heme. O tratamento com Nec-1 causou uma redução das concentrações de TNF no sobrenadante de macrófagos estimulados com heme (Fig. 19). Esse efeito inibitório da Nec-1 foi específico para o heme, já que não afetou a capacidade do LPS em induzir a produção de TNF. Esse resultado sugere que a Nec-1 pode agir inibindo a produção de TNF e, conseqüentemente, a morte celular induzida pelo heme.

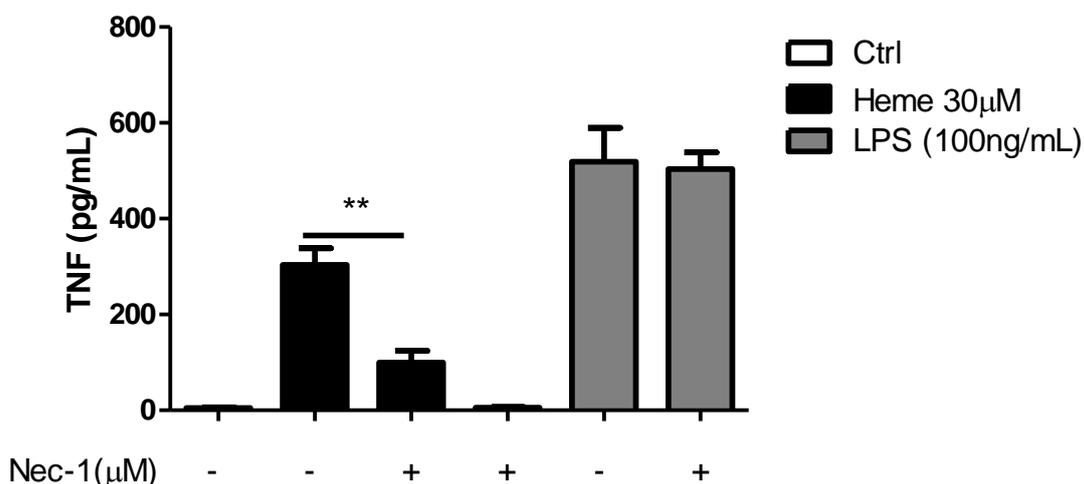
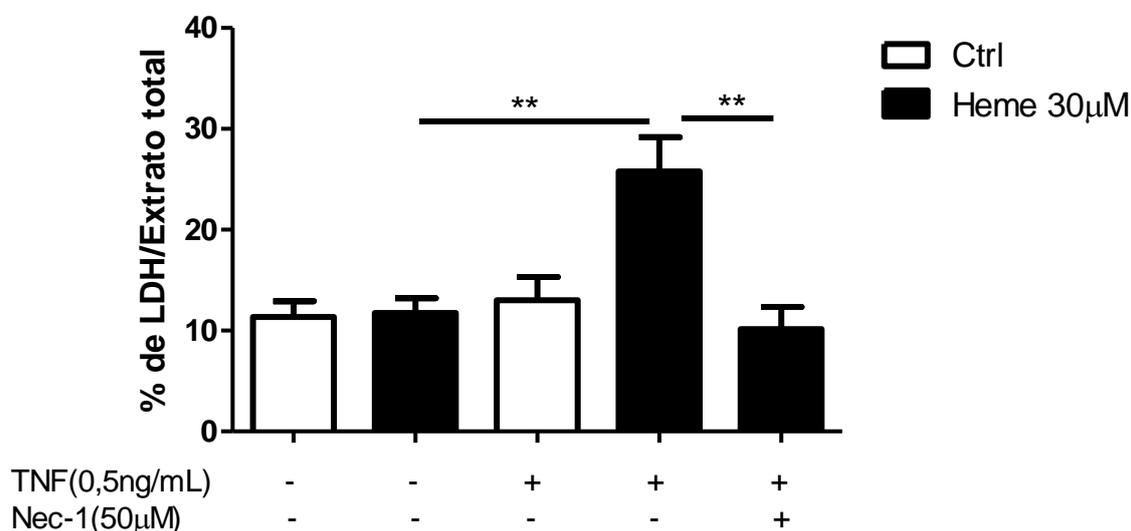


Fig. 19: Efeito inibitório da Nec-1 na produção de TNF induzida pelo heme. As células foram pré-incubadas com a Nec-1 (50 µM) 15 minutos antes da estimulação com heme ou LPS (100 ng/mL). O experimento apresentou um tempo total de 6h a partir da estimulação com heme. As barras na cor negra representam as amostras com soro e as barras na cor cinza as amostras estimuladas na ausência de soro. O tratamento com Polimixina B (PMX) (15 µg/mL) foi realizado 10 minutos antes da estimulação com LPS. Figura obtida da média de 3 experimentos independentes. ** $p < 0.01$

5.6.2- A ação protetora da Nec-1 independe da inibição da produção de TNF

Para avaliar o mecanismo protetor da Nec-1 na morte de macrófagos induzida pelo heme investigamos se a capacidade inibitória da Nec-1 dependeria da inibição na produção de TNF ou ocorreria mesmo na presença de TNF. Nós realizamos experimentos com macrófagos obtidos de animais deficientes de TLR4 tratados com Nec-1 (50 μ M) e estimulados com heme (30 μ M) + TNFr (0,5 ng/mL). Nestas condições a Nec-1 continuou protegendo os macrófagos da morte induzida pelo heme (fig. 20). Sendo assim, a capacidade de inibição da morte celular apresentada pela Nec-1 é independente de seu efeito inibitório na produção de TNF.



5.6.3- Nec-1 não altera a produção de espécies reativas induzida pelo heme.

Como havíamos demonstrado a importante participação de ROS geradas pelo heme no mecanismo de indução de morte em macrófagos, decidimos avaliar uma possível ação da Nec-1 modulando a produção de ROS induzida pelo heme. O tratamento com a Nec-1 não interferiu com a geração de ROS induzida pelo heme (fig. 21). Este resultado sugere que o efeito da Nec-1 ocorre em uma via independente ou posterior à geração de ROS pelo heme.

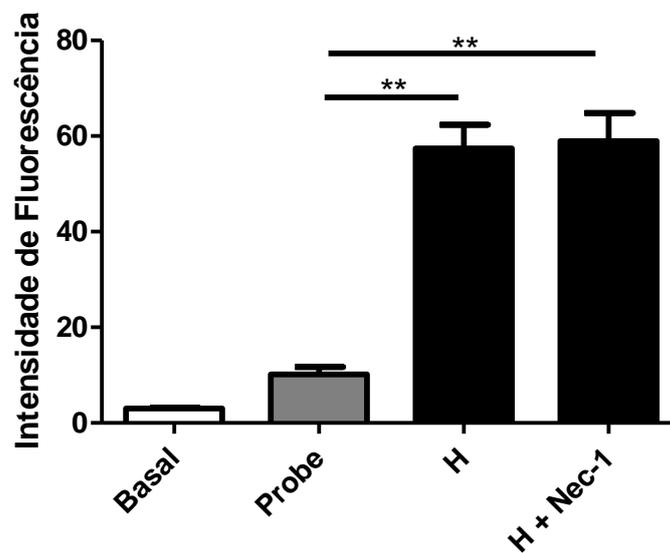
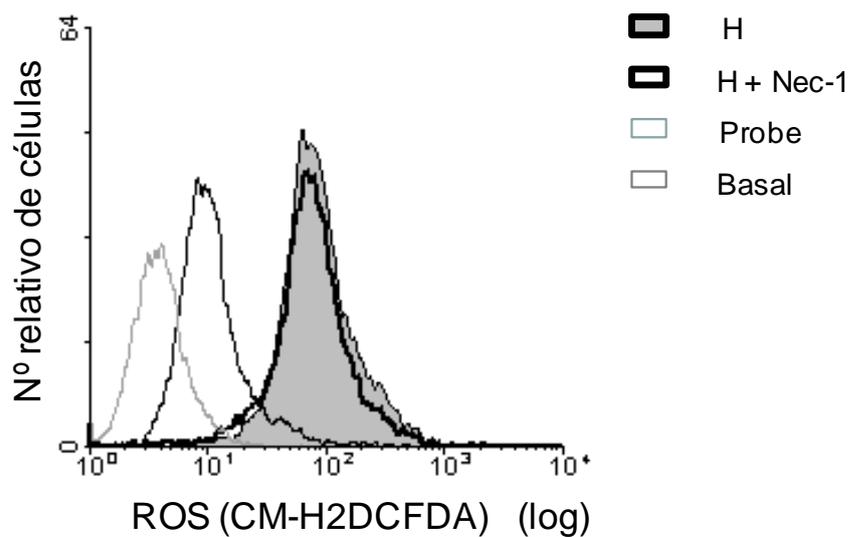


Fig. 21: Efeito da Nec-1 sobre a produção de espécies reativas induzidas pelo heme. Os macrófagos foram pré-incubados com a Nec-1 (50 μ M) por 15 minutos e depois estimulados por 1 hora com heme (30 μ M), na ausência de SFB. Figura obtida da média de 3 experimentos independentes.

5.7- Efeito do heme sobre a viabilidade de neutrófilos

Resolvemos avaliar também se o heme seria capaz de induzir a morte de outra célula leucocitária, os neutrófilos. Sendo assim, avaliamos a viabilidade de neutrófilos humanos isolados do sangue periférico de doadores saudáveis estimulados com heme na presença ou na ausência de soro fetal (fig. 22A). O pré-tratamento de neutrófilos com Nec-1 protegeu estas células da morte induzida pelo heme (fig. 22B). Este resultado indica que este fenômeno de morte induzido pelo heme não é restrito aos macrófagos.

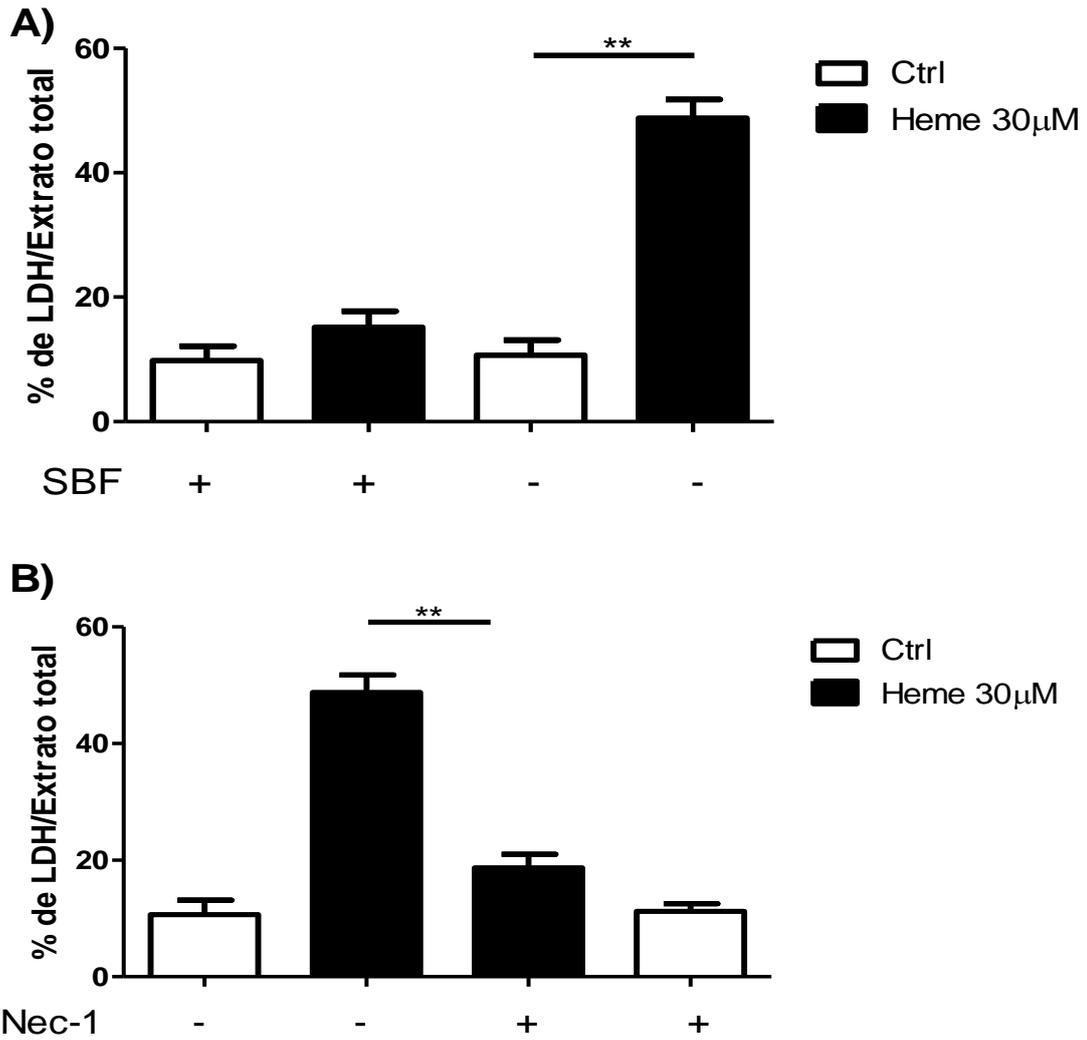


Fig. 22: Efeito citotóxico do heme em neutrófilos humanos e inibição do mesmo pela Nec-1. Neutrófilos humanos foram obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis como descrito anteriormente. A) Os neutrófilos foram estimulados com heme 30 μM na presença e ausência de SBF por 4h a 37°C com 5% de CO₂. B) Neutrófilos foram pré-incubados com a Nec-1 (50 μM) 15 minutos a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, os neutrófilos foram estimulados com heme (30 μM) por 4h apenas na ausência de SFB. Figura obtida da média de 2 experimentos independentes. ** p<0.01

6- DISCUSSÃO

A molécula de heme participa estrutural e funcionalmente de uma grande variedade de proteínas cruciais (hemoproteínas), estando envolvido em diversos processos celulares, como transcrição\tradução gênica, diferenciação celular e proliferação (revisado por ABRAHAM *et al.*, 1983; revisado por BERI & CHANDRA, 1993; revisado por SASSA & NAGAI, 1996; revisado por, ISSAC & DAWSON, 1999; revisado por PONKA, 1999).

Em contraste às funções fisiológicas do heme ligado as hemoproteínas, um acúmulo excessivo de heme livre pode causar dano celular e injúria tecidual, uma vez que esta molécula catalisa a formação de ROS, o que resulta em estresse oxidativo (JENEY *et al.*, 2002; revisado por SASSA, 2004). Portanto, quando liberado das hemoproteínas o heme pode promover a formação de radicais livres, participando desta forma na oxidação de lipídios, proteínas e DNA (BALLA *et al.*, 1991 A; BALLA *et al.*, 1991 B; revisado por BERI & CHANDRA, 1993; revisado por RYTER & TYRRELL, 2000).

A presença de heme não ligado à hemoproteínas representa grande perigo para as células. Assim existem diversos mecanismos para conter o de estresse oxidativo e inflamação induzida pelo heme. Esses mecanismos podem ser intracelulares (atividade das proteínas HO-1 e HO-2) ou extracelulares, os “scavengers” (hemopexina, albumina, haptoglobina) (IMMENSCHUH *et al.*, 1997; revisado por MAINES, 1997; CASTELLANI *et al.*, 2000).

Nossos resultados demonstraram a capacidade citotóxica do heme, reforçando os efeitos deletérios apresentados por essa molécula (JENEY *et al.*, 2002; LAIRD *et al.*, 2008; CHOW *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2009).

A capacidade do soro em inibir esse efeito citotóxico indica que esse fenômeno de morte celular pode restringir-se a sítios e situações específicas, como por exemplo, eventos hemolíticos. Alguns eventos patológicos podem gerar o acúmulo de grandes quantidades de hemoproteínas ou heme (hemólise, rabdomiólise, isquemia/reperfusão, hemorragia), de até 10 mM de heme em coágulos (LETARTE *et al.*, 1993; NATH *et al.*, 1998, revisado por ALAYASH, 2000). Esse acúmulo de heme pode saturar os mecanismos de contenção, permitindo-se assim que o heme exerça seus efeitos inflamatórios

e/ou deletérios (MULLER-EBERHARD *et al.*, 1968; revisado por JACOB, 1994; WAGENER *et al.*, 2001; JENEY *et al.*, 2002).

Os mecanismos de ação associados aos efeitos desencadeados pelo heme ainda não são totalmente conhecidos, alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade do heme em ligar-se a receptores na membrana celular, desencadeando seus efeitos de sinalização (revisado por GALBRAITH, 1990; WORTHINGTON *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2003; QUIGLEY *et al.*, 2004; SHAYEGHI *et al.*, 2005; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Nosso grupo mostrou em um trabalho anterior que o heme é um ligante de TLR4 e o engajamento deste receptor induz a produção de TNF de maneira dependente desse receptor em macrófagos na ausência de soro fetal (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Sendo assim, avaliamos a importância dessa ativação de TLR4 no mecanismo de indução de morte pelo heme. Constatamos que as células deficientes de TLR4 foram resistentes ao efeito citotóxico do heme.

A molécula de TNF participa de processos de morte celular (CARSWELL *et al.*, 1975; VERCAMEN *et al.*, 1997; VERCAMEN *et al.*, 1998 A; WALLACH *et al.*, 2002; HITOMI *et al.*, 2008) e pode ser induzida pela ação do heme (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Avaliamos a participação do TNF no fenômeno de morte, fornecendo o recombinante de TNF (TNFr) às células deficientes em TLR4 estimuladas com heme. Ao adicionamos TNFr (0,5 ng/mL) os macrófagos *TLR4*^{-/-} tornam-se sensíveis ao mecanismo de morte induzido pelo heme. Esse resultado indica que a citotoxicidade do heme é dependente da presença de TNF.

Nosso próximo passo foi investigar como estaria ocorrendo à sinalização mediada pelo TNF. Avaliamos a resistência de células deficientes do receptor 1 de TNF (TNFR1) ao processo de morte estudado, já que este receptor apresenta um domínio de morte intracelular e participa dos mecanismos de morte induzidos pelo TNF (revisado por SAIKUMAR *et al.*, 1999). Assim como as células deficientes de TLR4, as células TNFR1 deficientes se mostraram resistentes a indução de morte pelo heme. Estes resultados indicam que o

processo de morte requer um eixo de sinalização via TNFR-1, para a sua execução.

O heme é um potente gerador de radicais livres e a deficiência de HO-1, está relacionada com várias complicações oxidativas e inflamatórias (revisado por PONS & TONEGAWA, 1997 A; WAGENER *et al.*, 2003). O heme é capaz de induzir a produção de ânion superóxido por neutrófilos estimulados *in vitro* (GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2002) de maneira dependente de proteína G inibitória, de PI3K e PKC (PORTO *et al.*, 2007). O heme também induz espécies reativas de oxigênio em macrófagos murinos envolvendo a ativação de ERK e produção de TNF (FERNANDEZ, 2007). CHOW *et al.*, 2008; LAIRD *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2009 demonstram a participação de ROS em processos de morte celular induzidos por heme. Assim sendo, resolvemos avaliar a participação de espécies reativas de oxigênio neste processo de morte. Nossos resultados demonstraram que as espécies reativas de oxigênio possuem grande importância para o desenvolvimento do processo de morte, já que o uso de N-acetilcisteína inibiu a morte dos macrófagos. Podemos deduzir um eixo de sinalização composto por TLR4-TNF-TNFR1 e a dependência da formação de espécies reativas de oxigênio para a desencadeamento do efeito citotóxico do heme.

Avaliamos as formas de morte celular que poderiam estar sendo induzidas pelo heme. O heme possui a capacidade de inibir a apoptose (ARRUDA *et al.*, 2004; LANG *et al.*, 2004), mas também sensibilizar hepatócitos para a apoptose. Além disso, após iniciarmos esse trabalho, LAIRD *et al.*, 2008 demonstraram que o heme é capaz de induzir a morte de astrócitos por Necroptose.

A Necroptose é caracterizada como uma morte celular programada alternativa, não apoptótica e caspase independente (revisado por DEGTEREV & YUAN, 2008). As células que sofrem esse processo apresentam uma morfologia necrótica. Ela pode ser iniciada pela estimulação de receptores da família TNF contendo domínios de morte, na presença de inibidores de apoptose (VERCAMMEN *et al.*, 1998 A; VERCAMMEN *et al.*, 1998 B; KHWAJA & TATTON, 1999; MATSUMURA *et al.*, 2000) ou por meio de mutações na caspase 8 ou no FADD (KAWAHARA *et al.*, 1998; HOLLER *et al.*, 2000; CHAN

et al., 2003; DEGTEREV *et al.*, 2005). Além disso, ela é dependente da atividade quinase de RIP1, diferentemente de processos apoptóticos (HOLLER *et al.*, 2000; revisado por FESTJENS *et al.*, 2006).

A modulação farmacológica da necroptose foi possibilitada a partir da descoberta das necrostatinas, pequenas moléculas que inibem o processo de sinalização necroptótico, mas não a apoptose induzida por TNF (DEGTEREV *et al.*, 2005; TENG *et al.*, 2005; JAGTAP *et al.*, 2007).

A Nec-1 inibiu a morte induzida pelo heme, demonstrando que esta molécula induz morte dependente da atividade quinase de RIP1 (necroptose) em macrófagos murinos e neutrófilos humanos. Além disso, a Nec-1 conseguiu reduzir, significativamente, a produção de TNF induzida pelo heme, mas não pelo LPS.

Já havíamos demonstrado a indução de morte em células TLR4 deficientes estimuladas com heme e TNF recombinante. Sendo assim, realizamos o pré-tratamento de macrófagos (TLR4^{-/-}) com Nec-1 e fizemos o estímulo com heme mais TNFr. As células tratadas com Nec-1 foram resistentes ao estímulo de morte, sugerindo que a ação protetora da Nec-1 ocorre independentemente de sua capacidade de reduzir a produção de TNF.

Nossos resultados demonstraram o envolvimento das ROS na morte induzida pelo heme, além disto, as ROS apresentam um papel destaque no mecanismo necroptótico (DEGTEREV *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2009). Entretanto, o pré-tratamento dos macrófagos com Nec-1 não alterou a geração de espécies reativas, apesar de inibir o processo de morte celular.

A sinalização via TLR4 ativa ROS (BAE *et al.*, 2009) e RIP1 (VIVARELLI *et al.*, 2004), indispensáveis para o mecanismo necroptótico. Contudo, FERNANDEZ (2007) demonstrou que a produção de ROS em macrófagos induzida por heme independe da presença de TLR4. Isso indica que a produção de ROS induzida pelo heme ocorre independente da ativação de RIP1 ou TLR4. Esses resultados também indicam que na via de morte o ROS produzido pelo heme e a ativação de RIP1 estariam agindo em paralelo (dois sinais), pois a ausência de um desses componentes inibe a morte celular.

As ROS prolongam a sinalização de NF-KB desencadeada pelo TNFR, retardando a poliubiquitinação de RIP-1 (ENESA *et al.*, 2008). Além disso, a proteína RIP1 é necessária para a geração de ROS por TNF e necessária para o início da morte necroptótica (LIN *et al.*, 2004; revisado por FESTJENS *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2009).

ARRUDA *et al.*, 2004 demonstraram que o heme, em doses baixas, inibe a indução espontânea de apoptose em neutrófilos humanos na ausência de soro, LANG *et al.*, 2004 demonstraram o mesmo fenômeno em monócitos humanos, independente de detectarem um aumento de expressão de caspase-3 nessas células. Já BLUMENTHAL *et al.*, 2005 demonstraram que metaloporfirinas inativam caspase -3 e -8.

Assim sendo, resolvemos investigar se o heme em concentrações mais elevadas apresentaria a capacidade de induzir morte celular, como demonstramos em macrófagos murinos. Nosso resultado indica que o heme (30 μ M) possui a capacidade de induzir a morte em neutrófilos humanos, quando comparamos com as células incubadas apenas com meio sem soro.

Sendo assim, a quantidade de heme disponível parece ser fundamental para direcionar os efeitos gerados por ele. Pois, em baixas doses, o heme apresentaria suas atividades citoprotetoras, como a inibição de apoptose, ao induzir a expressão de HO-1 (ARRUDA *et al.*, 2004; SEIXAS *et al.*, 2009). Contudo, em doses mais elevadas a atividade citotóxica do heme supera a capacidade citoprotetora da HO-1, prevalecendo o efeito deletério do heme, como demonstrado pelo acúmulo desta molécula em processos patológicos (MULLER-EBERHARD *et al.*, 1968; LETARTE *et al.*, 1993; revisado por JACOB, 1994; IMMESCHUH *et al.*, 1997; revisado por MAINES, 1997; NATH *et al.*, 1998; CASTELLANI *et al.*, 2000; revisado por ALAYASH, 2000; WAGENER *et al.*, 2001; JENEY *et al.*, 2002).

Além disso, investigamos o mecanismo envolvido na indução de morte em neutrófilos, para tanto incubamos estas células com nec-1. Os resultados indicam que ocorre a necroptose dos neutrófilos, pois esta substância conseguiu manter os níveis de viabilidade similares ao controle não estimulado com heme. Esse resultado demonstra que o heme é capaz de induzir

processos de necroptose em outros tipos celulares que participam de processos inflamatórios, não apenas macrófagos.

Mecanismos de morte celular ocorrem em condições de estresse oxidativo, resultando na liberação de grandes quantidades de heme e conseqüentemente exacerbando a inflamação e a lesão celular (FERRIS *et al.*, 1999; PETRACHE *et al.*, 2000; revisado por FESTJENS *et al.*, 2006).

Essa liberação de heme em decorrência de morte celular associado a sua toxicidade para leucócitos nos permite inferir que a ocorrência da necroptose pode influenciar no desenvolvimento e resolução dos processos inflamatórios. Assim, o acúmulo de heme/hemoproteínas, em nível tecidual e/ou sérico, em pacientes que apresentem processo de hemólise intensa, deveria ser evitado, por meio da modulação dos mecanismos de “scavenger” (hemopexina, albumina, antioxidantes e outros), a fim de prevenir os efeitos deletérios dessas moléculas.

7- CONCLUSÃO

Os nossos resultados confirmam que o heme é capaz de induzir a morte celular. Todavia, esse processo de citotoxicidade induzido pelo excesso de heme em macrófagos não ocorre de forma desregulada, sendo necessária a participação de várias moléculas na sinalização e/ou indução deste processo, como a geração de espécies reativas de oxigênio, indução de TNF, presença de TLR4 e TNFR1 (fig. 23).

Além disso, a capacidade da Necrostatina-1 em inibir esse processo de morte demonstra que ele se trata de uma Necroptose. Somado a isso, a natureza inflamatória da necroptose e a capacidade citotóxica do heme em macrófagos e neutrófilos, durante eventos hemolíticos (ex.: hemorragia), podem influenciar no desenvolvimento e/ou resolução de processos inflamatórios, exacerbando-os e/ou afetando a eficiência na eliminação de patógenos.

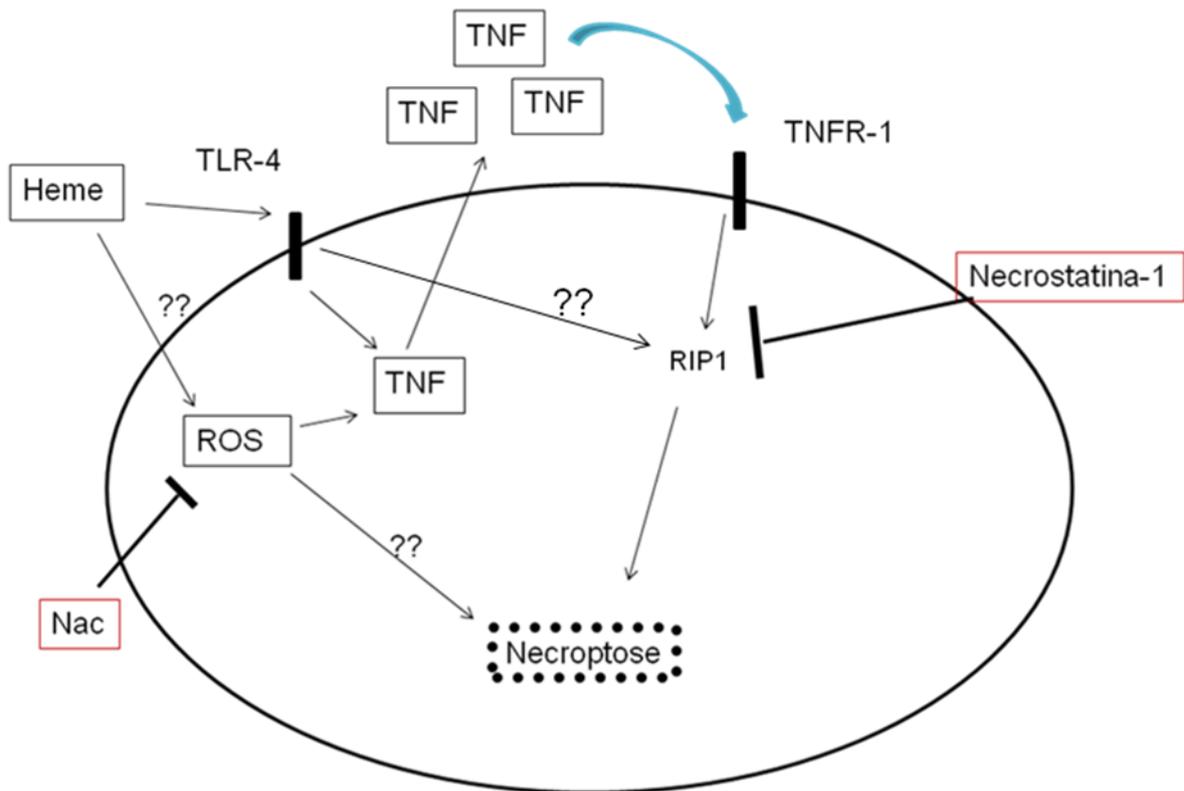


Fig. 23: Esquema dos mecanismos envolvidos na indução de necroptose pelo heme. A molécula de heme induziria a produção de TNF, de forma dependente de TLR4 e ROS. Esse TNF produzido sinalizaria via receptor de TNF tipo 1 (p55). Esse fato permite a ativação da capacidade quinase de RIP1, induzindo o desenvolvimento do processo de Necroptose, gerando a morte das células.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, A.K. **The fidelity of translation.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 28:81-100, 1983.
- ACEHAN, D.; JIANG, X.; MORGAN, D.; HEUSER, J.; WANG, X. & AKEY, C. **Three-Dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation.** *Mol. Cell,* 9:423–432, 2002.
- ALAYASH, A.L. **Hemoglobin-based blood substitutes and the hazards of blood radicals.** *Free Radic Res.,* 33(4):341-8, 2000.
- ALNEMRI, E.S.; LIVINGSTON, D.J.; NICHOLSON, D.W.; SALVENSEN, G.; THORNBERRY, N.A. & WONG, J. **Human ICE/CED-3 protease nomenclature.** *Cell* 87:171, 1996.
- AMANTEA, D.; NAPPI, G.; BERNARDIC, G.; BAGETTA, G. & Corasaniti, M. **Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators.** *FEBS Journal* 276 13–26, 2009.
- ARRUDA, M.; ROSSI, A.; FREITAS, M.; BARJA-FIDALGO, C. & GRAÇA-SOUZA, A. **Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-κB.** *J Immunol.,* 173:2023-2030, 2004.
- ASHKENAZI, A. **Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.** *Nat Rev Cancer.* 2(6):420-30, 2002.
- AVOGARO, A.; PAGNIN, E. & CALO, L. **Monocyte NADPH oxidase subunit p22phox and inducible Hemeoxygenase-1 gene expressions are increased in type II diabetic patients: relationship with oxidative stress.** *J Clin Endocrinol Metab,* 88(4):1753–1759, 2003.
- BAE, Y.S.; LEE, J.H.; CHOI, S.H.; KIM, S.; ALMAZAN, F.; WITZTUM, J.L. & MILLER, Y.I. **Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2.** *Circ Res.* 30;104(2):210-8, 2009.
- BAEHRECKE, E. **How death shapes life during development.** *Nat Rev Mol Cell Biol;* 3:779–787, 2002.
- BAEHRECKE, E. **Autophagy: dual roles in life and death?** *Nat Rev Mol Cell Biol.,* 6:505–510, 2005.
- BAKER, S. & REDDY, E. **Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily.** *Oncog.,* 24;17(25):3261-70, 1998.
- BALLA G, VERCELLOTTI G, MULLER-EBERHARD U, EATON J & JACOB H. **Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocyte and toxic oxygen species.** *Lab Invest;* 64: 648–655, 1991 A.
- BALLA, G.; JACOB, H.; EATON, J.; BELCHER, J. & VERCELLOTTI, G. **Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial cell injury.** *Arterioscler Thromb.* 11:1700–1711, 1991 B.
- BALLA, J.; JACOB, H.S.; BALLA, G.; NATH, K.; EATON, J. & VERCELLOTTI, G. **Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:9285- 9289, 1993.
- BALLA, J.; BALLA, G.; JENEY, K.; KAKUK, G.; JACOB, K. & VERCELLOTTI, G. **Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants.** *Blood,* 95:3442-3450, 2000.

BALLA, J.; VERCELLOTTI, G.; NATH, K.; YACHIE, A.; NAGY, E.; EATON, J. & BALLA, G. **Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury.** *Nephrol Dial Transplant.* 18, 5:8-12, 2003.

BAUER, M.; SCHUBERT, A.; ROCKS, O. & GRIMM, S. **Adenine Nucleotide Translocase-1, a Component of the Permeability Transition Pore, Can Dominantly Induce Apoptosis.** *J. Cell Biol.* 147(7):1493–1501, 1999.

BERI, R. & CHANDRA, R. **Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450.** *Drug Metab Rev.*, 25(1-2):49-152, 1993.

BEUTNER, G.; RUCK, A.; RIED, B. & BRDICZKA, D. **Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases.** *Biochim Biophys Acta.* 1368(1):7-18, 1998.

BERNARDI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PETRONILLI, V. & DI LISA, F. **Mitochondria and cell death: Mechanistic aspects and methodological issues.** *Eur. J. Biochem.* 264:687-701, 1999.

BLUMENTHAL, S.; KIEMER, A.; TIEGS, G.; SEYFRIED, S.; HOLTJE, M.; BRANDT, B.; HOLTJE, H.; ZAHLER, S. & VOLLMAR, A. **Metalloporphyrins inactivate caspase-3 and -8.** *FASEB J.* 19(10):1272-9, 2005.

BOATRIGT, K. M. & SALVENSEN, G. S. **Mechanisms of caspase activation.** *Curr. Opin. in Cell Biol.*, 15:725-731, 2003.

BOSSY-WETZEL, E. & GREEN, D. **Caspases Induce Cytochrome c Release from Mitochondria by Activating Cytosolic Factors.** *The J. Biol. Chem.*, 274:25, 18:17484–17490, 1999.

BOWMAN, S. & BREN, K. **The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment.** *Nat. Prod. Rep.*, 25, 1118–1130, 2008.

CARRELL, R. & Winterbourn, C. **The unstable hemoglobins.** *Tex. Rep. Biol. Med.* 40:431–45, 1980.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N. & WILLIAMSON, B. **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 72(9):3666-70, 1975.

CASTELLANI, R.J.; HARRIS, P.L.; LECROISEV, A.; IZADI-PRUNEVRE, N.; WANDERSMAN, C.; PERRY, G. & SMITH, M.A. **Evidence for a novel heme-binding protein, HasAh, in Alzheimer disease.** *Antioxid Redox Signal.*, 2(1):137-42, 2000.

CAUWELS, A.; JANSSEN, B.; WAEYTENS, A., CUVELIER, C. & BROUCKAERT, P. **Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2.** *Nat Immunol.*, 4(4):387-93, 2003.

CHAN, F.K.; SHISLER, J.; BIXBY, J.G.; FELICES, M.; ZHENG, L.; APPEL, M.; ORENSTEIN, J.; MOSS, B. LENARDO, M.J. **A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses.** *J Biol Chem.*, 19;278(51):51613-21, 2003.

CHANSON, M.; DEROUTTE, J.P.; ROTH, I.; FOGLIA, B.; SCERRI, I.; DUDEZ, T. & KWAK, B.R. **Gap junctional communication in tissue inflammation and repair.** *Biochim Biophys Acta.* 10;1711(2):197-207, 2005.

CHENG, C.; NOORDELOOS, A.; JENEY, V.; SOARES, M.; MOLL, F.; PASTERKAMP, G.; SERRUYS, P. & DUCKERS, H. **Heme Oxygenase 1 Determines Atherosclerotic Lesion Progression Into a Vulnerable Plaque.** *Circulation* 119;3017-3027, 2009.

CHO, Y.S.; CHALLA, S.; MOQUIN, D.; GENGA, R.; RAY, T.D.; GUILDFORD, M. & CHAN, F.K. **Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation.** *Cell.*, 12;137(6)1112-23, 2009.

CHOW, J.; HUANG, G.; LIN, H.; SHEN, S.; YANG, L. & CHEN, Y. **Cytotoxic effects of metal protoporphyrins in glioblastoma cells: Roles of albumin, reactive oxygen species, and heme oxygenase-1.** *Toxicol. Letters.*, 177:97–107, 2008.

CONLON, I. & RAFF, M. **Size control in animal development.** *Cell* 22;96(2):235-44, 1999.

DALY, J.; HAEUSLER, M.; HOGAN, C. & WOOD, E. **Massive intravascular haemolysis with T-activation and disseminated intravascular coagulation due to clostridial sepsis.** *Br. J. Haematol.* 134:553, 2006.

ISSAC, I.S. & DAWSON, J.H. **Haem iron-containing peroxidases.** *Essays Biochem.* 34:51-69, 1999.

DEGTEREV, A.; HUANG, Z.; BOYCE, M.; LI, Y.; JAGTAP, P.; MIZUSHIMA, N.; CUNY, G.; MITCHISON, T.; MOSKOWITZ, M. & YUAN, J. **Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury.** *Nat Chem Biol.*, 1:112–119, 2005.

DEGTEREV, A.; HITOMI, J.; GERMSHEID, M.; CH'EN I.; KORKINA, O.; TENG, X.; ABBOTT, D.; CUNY, G.; YUAN, C.; WAGNER, G.; HEDRICK, S.; GERBER, S.; LUGOVSKOY, A. & YUAN, J. **Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins.** *Nat Chem Biol.*, 4: 313–321, 2008.

DEGTEREV, A. & YUAN, J. **Expansion and evolution of cell death programmes.** *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9(5):378-90, 2008.

DENAULT, J. & SALVESEN, G. **Caspases: keys in the ignition of cell death.** *Chem Rev.*, 102:4489-500, 2002.

DESAGHER, S. & MARTINO, J. **Mitochondrial as the central control point of apoptosis.** *Trends Cell Biol.*, 10:369-76, 2000.

ENESA, K.; ITO, K.; LUONG, I. A.; THOJORNSEN, I.; PHUA, C.; TO, Y.; DEAN, J.; HASKARD, D.O.; BOYLE, J.; ADCOCK, I. & EVANS, P.C. **Hydrogen peroxide prolongs nuclear localization of NF-kappaB in activated cells by suppressing negative regulatory mechanisms.** *J Biol Chem.* 4;283(27):18582-90, 2008.

ENNS, S.; CORDEIRO, L.; SARR, A.; LUZ, J.; KIM, J.; FERREIRA-SILVA, V.; WOLFF, P. & BELIZÁRIO, E. **Tumor necrosis factor- α signaling cascades in apoptosis, necrosis, necroptosis and cell proliferation.** *Braz. J. morphol. Sci.* 23(1)109-120, 2006.

FERNANDEZ, P. L. **Caracterização do papel do heme na ativação de macrófagos e na resposta inflamatória na sepse.** 2007. 119f. Tese de Doutorado (Ciências Biológicas/Microbiologia). Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FERREIRA, A.; BALLA, J.; JENEY, V.; BALLA, G. & SOARES, M. **A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?** *J. Mol. Med.* 6:1097–111, 2008.

FERRIS, C.D.; JAFFREY, SR.; SAWA, A.; TKAHASHI, M.; BRADY, S.D.; BARROW, R.K.; TYSOE, S.A.; WOLOSKER, H.; BARANANO, D.E.; DORÉ, S.; POSS, K.D. & SNYDER, S.H. **Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron.** *Nat Cell Biol.*, 1(3):152-7, 1999.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGUE, T. & VANDENABEELE, P. **Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response.** *Biochim Biophys Acta.* 1757:1371–1387, 2006.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGUE, T.; CORNELIS, S. & VANDENABEELE, P. **RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die.** *Cell Death Differ.* 14(3):400-10, 2007.

FIGUEIREDO, R.; FERNÁNDEZ, P.; MOURÃO-SÁ, D.; PORTO, B.; DUTRA, F.; ALVES, L.; OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA, P.; GRAÇA-SOUZA, A. & BOZZA, M. **Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4.** *J Biol Chem.*, 13; 282(28): 20221-9, 2007.

FULDA, S.; GORMAN, A.; HORI, G. & SAMALI, A. **Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death.** *Int. J. Cell Biol.*, 2010.

FURUYAMA K, KANEKO K & VARGAS P. **Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis.** *Tohoku J Exp Med.* 213(1):1-16, 2007.

GALBRAITH, R. **Heme binding to Hep G2 human hepatoma cells.** *J. Hepatol.*, 10:305-310, 1990.

GEWIS, A. **Introduction to Apoptosis.** *Apo Review*, 2003.

GOLSTEIN, P. & KROEMER, G. **Cell death by necrosis: towards a molecular definition.** *Trends Biochem Sci*; 32:37–43, 2007.

Gonzalez-Michaca, L.; Farrugia, G.; Croatt, A.J.; Alam, J.; Nath, K.A. **Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells.** *Am J Physiol Renal Physiol.*, 286(2):370-7, 2004.

GOZZELINO, R.; JENEY, V. & SOARES, M. **Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50:323–54, 2010.

GRAÇA-SOUZA, A.; ARRUDA, M.; Freitas, M.; BARJA-FIDALGO, C. & OLIVEIRA, P. **Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes.** *Blood*, 99:4160-4165, 2002.

GROSS, A.; YIN, X.; WANG, K.; WEI, M.; JOCKEL, J.; MILLIMAN, C.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P. & KORSMEYER, S. **Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death.** *The J. Bio. Chem.*, 274(2:8)1156–1163, 1999.

GUIMARÃES, C. & LINDEN, R. **Apoptosis and alternative deathstyles.** *Eur. J. Biochem.* 271, 1638–1650, 2004.

HENGARTNER, M. **The biochemistry of apoptosis.** *Nature*, 407:770-76, 2000.

HISAHARA, S.; KANUKA, H.; SHOJI, S.; YOSHIKAWA, S.; OKANO, H. & MIURA, M. **Caenorhabditis elegans anti-apoptotic gene ced-9 prevents ced-3-induced cell death in Drosophila cells.** *J. Cell Sci.*, 111, 667-673, 1998.

HITOMI, J.; CHRISTOFFERSON, D.; NG, A.; YAO, J.; DEGTEREV, A.; XAVIER, R. & YUAN, J. **Identification of a Molecular Signaling Network that Regulates a Cellular Necrotic Cell Death Pathway.** *Cell* 135:1311–1323, 2008.

HOLLER, N.; ZARU, R.; MICHEAU, O.; THOME, M.; ATTINGER, A.; VALITUTTI, S.; BODMER, J.; SCHNEIDER, P.; SEED, B. & TSHOPP, J. **Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule.** *Nat Immunol.*, 1: 489–495, 2000.

- HORKY, M.; KOTALA, V.; ANTON, M. & WESIERSKA-GADEK, J. **Nucleolus and apoptosis.** Ann N Y Acad Sci., 973:258-64, 2002.
- HUA, Y.; KEEP, R.; HOFF, J. & XI, G. **Brain injury after intracerebral hemorrhage: the role of thrombin and iron.** Stroke 38:759–62, 2007.
- IMMENSCHUH, S.; NELL, C.; IWAHARA, S.; KATZ, N. & MULLER-EBERHARD, U. **Gene regulation of HBP 23 by metalloporphyrins and protoporphyrin IX in liver and hepatocyte cultures.** Biochem Biophys Res Commun. 24;231(3)667-70, 1997.
- JACOB, H.S. **Newly recognized causes of atherosclerosis: the role of microorganisms and of vascular iron overload.** J Lab Clin Med., 123(6)808-16, 1994.
- JAESCHKE, H. & LEMASTERS, J. **Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury.** Gastroenterology 125(4):1246-57, 2003.
- JAGTAP, P.G.; DEGTEREV, A.; CHOI, S.; KEYS, H.; YUAN, J. CUNY, G.D. **Structure-activity relationship study of tricyclic necroptosis inhibitors.** J Med Chem., 19;50(8):1886-95, 2007.
- JENEY, V.; BALLA, J.; YACHIE, A.; VARGA, Z.; VERCELLOTTI, G.; EATON, J. & BALLA, G. **Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme.** Blood, 100:879-887, 2002.
- KALAI, M.; VAN LOO, G.; VANDEN BERGHUE, T.; MEEUS, A.; BURM, W.; SAELENS, X. & VANDENABEELE, P. **Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA.** Cell Death Differ., 9: 981–994, 2002.
- KAPITULNIK, J. & MAINES, M. **Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin.** Trends Pharmacol. Sci. 30:129–37, 2009.
- KAUFMANN, S. & EARNSHAW, W. **Induction of apoptosis by cancer chemotherapy.** Exp Cell Res. 256(1):42-9, 2000.
- KAWAHARA, A.; OHSWA, Y.; MATSUMURA, H.; UCHIYAM, A. & NAGATA, S. **Caspase-independent cell killing by Fas associated protein with death domain.** J. Cell Biol. 143:1353–1360, 1998.
- KELLIHER, M.; GRIMM, S.; ISHIDA, Y.; KUO, F.; STANGER, B. & LEDER, P. **The Death Domain Kinase RIP Mediates the TNF-Induced NF κ B Signal.** Immunity, 8:297–303, 1998.
- KERR, J.; WYLLIE, A. & Currie, A. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Br. J. Cancer 26, 239–257, 1972.
- KHWAIA, A. & TATTON, L. **Resistance to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha can be overcome by inhibition of a FADD/caspase-dependent signaling pathway.** J Biol Chem., 17;274(51):36817-23, 1999.
- KROEMER, G.; PETIT, P.; ZAMZAMI, N.; VAYSSIÈRE, J. & MIGNOTTE, B. **The biochemistry of programmed cell death.** FASEB J., 9(13)1277-87, 1995.
- KROEMER, G.; ZAMZAMI, N. & SUSIN, S. **Mitochondrial control of apoptosis.** Immunol Today. 18(1):44-51, 1997.
- KROEMER, G. & REED, J. **Mitochondrial control of cell death.** Nat Med. 6(5)513-9, 2000.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDERNABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.; BAEHRECKE, E.; BLAGOSKLONNY, M.; EL-DEIRY, W.; GOLDSTEIN, P.; GREEN, D.; HENGARTNER, D.; KNIGHT, R.; KUMAR, S.; LIPTON, S.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTIN, M.; ZHICOTOVSKY, B. & MELINO, G. **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** Cell Death and Differ., 16, 3–11, 2009.

KRISHNAMURTHY, P.; DU, P.; FUKUDA, Y.; SUN, D.; SAMPATH, J.; MERCER, K.; WANG, J.; SOSA-PINEDA, B.; MURTI, K. & SCHUETZ, J. **Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter.** *Nature*, 443, 7111:586-589, 2006.

LAIRD, M.; WAKADE, C.; ALLEYNE, C. & DHANDAPANI, K. **Hemin-induced necroptosis involves glutathione depletion in mouse astrocytes.** *Free Radic Biol Med.* 15;45(8)1103-14, 2008.

LAVRIK, I.; GOLKS, A. & KRAMMER, P. **Caspases: pharmacological manipulation of cell death.** *J Clin Invest.* 115(10)2665–2672, 2005.

LETARTE, P.B.; LIEBERMAN, K.; NAGATANI, K.; HAWORTH, R.A.; ODELL, G.B. & DUFF, T.A. **Hemin: levels in experimental subarachnoid hematoma and effects on dissociated vascular smooth-muscle cells.** *J Neurosurg.*, 79(2)252-5, 1993.

LEVINE, B. & YUAN, J. **Autophagy in cell death: an innocent convict?** *J Clin Invest.*, 115:2679–2688, 2005.

LI, H.; ZHU, H.; XU, C. & YUAN, J. **Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.** *Cell*, 94(4)491-501, 1998.

LOEFFLER, M. & KROEMER, G. **The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita.** *Exp Cell Res.*, 256(1)19-26, 2000.

LUO, X.; BUDIHARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C. & WANG, X. **Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors.** *Cell*, 94(21)481–490, 1998.

MEIER, P.; FINCH, A. & EVAN, G. **Apoptosis in development.** *Nature*; 407:796-801, 2000.

MAINES, M. **Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications.** *FASEB J.* 2(10):2557-68, 1988.

MARCHETTI, P.; DECAUDIN, D.; MACHO, A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; SUSIN, S. & KROEMER, G. **Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function.** *Eur J Immunol.* 27(1):289-96, 1997.

MATSUMURA, H.; SHIMIZU, Y.; OHSAWA, Y.; KAWAHARA, A.; UCHIVAMA, Y. & NAGATA, S. **Necrotic death pathway in Fas receptor signaling.** *J Cell Biol.*, 11;151(6)1247-56, 2000.

MEYLAN, E. & TSCHOPP, J. **The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress.** *Trends Biochem Sci.* 30(3)151-9, 2005.

MIGNOTTE, B. & VAVSSIÈRE, J. **Mitochondria and apoptosis.** *Eur J Biochem.*, 15;252(1):1-15, 1998.

MILLER, Y. & SHAKLAI, N. **Oxidative crosslinking of LDL protein induced by hemin: involvement of tyrosines.** *Biochem Mol Biol Int*, 34:1121–1129, 1994.

MORGAN, M.J.; KIM, Y.S. & LIU, Z.G. **TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death.** *Cell Res.*, 18(3):343-9, 2008.

MULLER-EBERHARD, U.; JAVID, J.; LIEM, H.H.; HANSTEIN, A. HANNA, M. **Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases.** *Blood.* 32(5):811-5, 1968.

NAISMITH, J. & SPRANG, S. **Modularity in the TNF-receptor family.** *Trends Biochem Sci.*; 23:74-79, 1998.

NATH, K.A.; GRANDE, J.P.; CROATT, A.J.; LIKELY, S.; HEBBEL, R.P. & ENRIGHT, H. **Intracellular targets in heme protein-induced renal injury.** *Kidney Int.*, 53(1)100-11, 1998.

NICHOLSON, W. & THORNBERRY, A. **Caspases: killer proteases.** Trends Biochem Sci., 22:299-306, 1997.

NISHI, K.; ODA, T.; TAKABUCHI, S.; ODA, S.; FUKUDA, K.; ADACHI, T.; SEMENZA, G.L.; SHINGU, K. HIROTA, K. **LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner.** Antioxid Redox Signal., 10(5):983-95, 2008.

OPFERMAN, J. **Apoptosis in the development of the immune system.** Cell Death and Differ., 15, 234–242, 2008.

PAE, H. & CHUNG, H. **Heme Oxygenase-1: Its Therapeutic Roles in Inflammatory Diseases.** Immune Network 9(1):12-19, 2009.

PAMPLONA, A.; FERREIRA, A.; BALLA, J.; JENEY, V.; BALLA, G.; EPIPHANIO, S.; CHORA, A.; RODRIGUES, C.; GREGOIRE, I.; CUNHA-RODRIGUES, M.; PORTUGAL, S.; SOARES, M. & MOTA, M. **Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria.** Nat. Med., 13(6):703-10, 2007.

PETRACHE, I.; OTTERBEIN, L.E.; ALAM, J.; WIEGAND, G.W. & CHOI, A.M. **Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 278(2):312-9, 2000.

PETRONELLI, A.; RICCIONI, R.; PASQUINI, L.; PETRUCCI, E. & TESTA, U. **Apoptosis-based therapies for hematological malignancies.** Drugs Fut., 30(7): 707, 2005.

PIANTADOSI, C. **Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress.** Free Radic. Biol.Med. 45:562–69, 2008.

PONKA, P. **Cell Biology of Heme.** The Am. J. Med. Sci., 318(4), 241, 1999.

PORTO, B.; ALVES, L.; FERNÁNDEZ, P.; DUTRA, T.; FIGUEIREDO, R.; GRAÇA-SOUZA, A. & Bozza, M. **Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors.** J Biol Chem. Aug 17;282(33):24430-6, 2007.

POSS, K. & TONEGAWA, S. **Reduced stress defense in heme oxygenase 1 deficient cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 10925–10930, 1997 A.

POSS, K. & TONEGAWA, S. **Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 94: 10919–10924, 1997 B.

QUIGLEY, J.; YANG, Z.; WORTHINGTON, M.; PHILLIPS, J.; SABO, K.; SABATH, D.; BERG, C.; SASSA, S.; WOOD, B. & ABKOWITZ, J. **Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis.** Cell, 118, 757–766, 2004.

RANGANATH, R. & NAGASHREE, N. **Role of programmed cell death in development.** Int Rev Cytol.; 202:159-242, 2001.

REED, J. **Mechanisms of Apoptosis.** Am J Pathol, 157:1415–1430, 2000.

RYTER, S.W. & TYRREL, R.M. **The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties.** Free Radic Biol Med., 15;28(2)289-309, 2000.

SAIKUMAR, P.; DONG, Z.; MIKHAILOV, V.; DENTON, M.; WEINBERG, J.M. VENKATACHALAM, M.A. **Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease.** Am J Med., 107(5)489-506, 1999.

SARASTE, A. & PULKKI, K. **Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis.** Cardiovasc Res., 45:528-37, 2000.

SASSA, S. & NAGAI, T. **The role of heme in gene expression.** *Int J Hematol.*, 63(3):167-78, 1996.

SASSA, S. **Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IX alpha, carbon monoxide?** *Antioxid Redox Signal*, 6:819-824, 2004.

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; FRIESEN, C.; LI, F.; TOMASELLI, K.J.; DEBATIN, K.; KRAMMER, P. H. & PETER M. E. **Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.** *The Embo J.*, 17(6):1675-1687, 1998.

SCHNEIDER-BRACHERT, W.; TCHIKOV, V.; NEUMEVER, I.; JAKOB, M.; WINOTOMORBACH, S.; HELD-FEINDT, J.; HEINRICH, M.; MERKEL, O.; EHRENSCHWENDER, M.; ADAM, D.; MENTLEIN, R.; KABELITZ, D. & SCHUTZE, S. **Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles.** *Immunity*. 21(3):415-28, 2004.

SEIXAS, E.; GOZZEKINO, R.; CHORA, A.; FERREIRA, A.; SILVA, G.; LARSEN, R.; REBELO, S.; PENIDO, C.; SMITH, N.; COUTINHO, A. & SOARES, M. **Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria.** *Proc Natl Acad Sci USA.*, 15;106(37):15837-42, 2009.

SHAYEGHI, M.; LATUNDE-DADA, G.; OAKHILL, J.; LAFTAH, A.; TAKEUCHI, K.; HALLIDAY, N.; KHAN, Y.; WARLEY, A.; McCANN, F.; HEDDER, R.; FRAZER, E. D.; ANDERSON, G.; VULPE, C.; SIMPSON, R. & MCKIE, A. **Identification of an Intestinal Heme Transporter.** *Cell*, 122:789–801, 2005.

SHIBAHARA S. **The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism.** *Tohoku J Exp Med.* 200(4):167-86, 2003.

SIKORSKI, E.; HOCK, T.; HILL-KAPTURCZAK, N. & AGARWAL, A. **The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury.** *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286:425–441, 2004.

SINGLETON, J. & LASTER, L. **Biliverdin reductase of guinea pig liver.** *J. Biol. Chem.* 240:4780–89, 1965.

SLEE, E.; HARTE, M.; KLUCK, R.; WOLF, B.; CASIANO, C.; NEWMAYER, D.; WANG, H.; REED, J.; NICHOLSON, D.; ALNEMRI, E.; GREEN, D. & MARTIN, S. **Ordering the Cytochrome-c initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner.** *The J. Cell Biol.*, 144(2):281-292, 1999.

SOARES, M. & BACH, F. **Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential.** *Trends Mol. Med.* 15:50–58, 2009.

STELLER, H. **Mechanisms and genes of cellular suicide.** *Sci.*, 10;267(5203):1445-9, 1995.

STOCKER, R.; YAMAMOTO, Y.; McDONAGH, A.; GLAZER, A. & AMES, B. **Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance.** *Science* 235:1043–46, 1987.

SUSIN, S.; LORENZO, H.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B.; BROTHERS, G.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M.; LAROCLETTE, N.; GOODLETT, D.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, PENNINGER, J. & KROEMER, G. **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *Nat.*, 397(6718):441-6, 1999.

TAKAKI, S.; TAKEYAMA, N.; KAJITA, Y.; YABUKI, T.; NOGUCHI, H.; MIKI, Y.; INOUE, Y.; NAKAGAWA, T. & NOGUCHI, H. **Beneficial effects of the heme oxygenase-1/carbon monoxide system in patients with severe sepsis/septic shock.** *Intensive Care Med* 36:42–48, 2010.

TANG, X.; XU, R.; REYNOLDS, M.; GARCIA, M.; HEINEMANN, S. & HOSHI, T. **Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels.** *Nature*, 425:531-535, 2003.

TENG, X.; DEGTEREV, A.; JAGTAP, P.; XING, X.; CHOI, S.; DENU, R.; YUAN, J. & CUNY, G.D. **Structure-activity relationship study of novel necroptosis inhibitors.** *Bioorg Med Chem Lett.* 15;15(22):5039-44, 2005.

THORNBERRY, N. **Caspases: key mediators of apoptosis.** *Chem. & Biol.*, 5:5, 1998.

TOLOSANO, E.; HIRSCH, E.; PATRUCCO, E.; CAMASCHELLA, C.; NAVONE, R.; SILENGO, L. & ALTRUDA, F. **Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice.** *Blood.* 1;94(11):3906-14, 1999.

TRUE, A.; OLIVE, M.; BOEHM, M.; SAN, H.; WESTRICK, R.; RAGHVACHARI, N.; XU, X.; LYNN, E.; SACK, M.; MUNSON, P.; GLADWIN, P. & NABEL, E. **Heme Oxygenase-1 deficiency accelerates formation of arterial thrombosis through oxidative damage to the endothelium, which is rescued by inhaled carbon monoxide.** *Circ Res.* 101:893-901, 2007.

VAN CRUCHTEN, S. & VAN DEN BROECK, W. **Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis.** *Anat. Histol. Embryol.*, 31(4):214-23, 2002.

VERCAMMEN, D.; VANDENABEELE, P.; BEVAERT, R.; DECLERCQ, W. & FIERS, W. **Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells.** *Cytokine.* 9(11):801-8, 1997.

VERCAMMEN, D.; BEYAERT, R.; DENECKER, G.; GOOSSENS, V.; VAN LOO, G.; DECLERCQ, W.; GOOTEN, J.; FRIES, W. & VANDENABEELE, P. **Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor.** *J. Exp. Med.*, 187:1477-1485, 1998 A.

VERCAMMEN, D.; BROUCKAERT, G.; DENECKER, G.; VAN CRAEN, M.; DECLERCQ, W.; FRIES, W. & VANDENABEELE, P. **Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways.** *J Exp Med.*, 188(5)919-30, 1998 B.

VERHAGEN, A.; EKERT, P.; PAKUSH, M.; REID, G.; MORITZ, R.; SIMPSON, R. & VAUX, D. **Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins.** *Cell*, 102:43-53, 2000.

VERHAGEN, A.; SILKE, J.; EKERT, P.; PAKUSH, M.; KAUFMANN, H.; CONNOLLY, L.; DAY, C.; TIKOO, A.; BURKE, R.; WROBEL, C.; MORITZ, R. & VAUX, D. **HtrA2 Promotes Cell Death through Its Serine Protease Activity and Its Ability to Antagonize Inhibitor of Apoptosis Proteins.** *J. Biol. Chem.*, 277(1)445-454, 2002.

VIVARELLI, M.S.; McDONALD, D.; MILLER, M.; CUSSON, N.; KELLIHER, M. GEHA, R.S. **RIP links TLR4 to Akt and is essential for cell survival in response to LPS stimulation.** *J Exp Med.*, 2;200(3):399-404, 2004.

XU, X.; CHUA, C.C.; KONG, J.; KOSTRZEWA, R.M.; KUMARAGURU, U.; HAMDY, R.C. & CHUA, B.H. **Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells.** *J Neurochem.* 103(5):2004-14, 2007.

YOULE, R. J. & STRASSER, A. **The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(1):47-59, 2008.

YU, L.; LEONARDO, M. & BAEHRECKE, E. **Autophagy and caspases: a new cell death program.** *Cell Cycle.* 3(9):1124-6, 2004.

YUAN, J. **Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death.** *J Cell Biochem.* 60(1):4-11, 1996.

WAGENER, F.; FELDMAN, E.; De WITTE, T. & ABRAHAM, A. **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, 1997.

WAGENER, F.; Da SILVA, J.; FARLEY, T.; De WITTE, T.; KAPPAS, A. & ABRAHAM, N. **Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial Intracellular adhesion molecule 1 expression.** J Pharmacol Exp Ther., 291,416-423, 1999.

WAGENER F, EGGERT, A.; BOERMAN, O.; OYEN, W.; VERHOFSTAD, A.; ABRAHAM, N.; ADEMA, G.; VAN KOOYK, Y.; De WITTE, T. & FIGDOR, C. **Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase.** Blood, 98, 1802-1811, 2001.

WAGENER, F.; VOLK, H.; WILLIS, D.; ABRAHAM, N.; SOARES, M.; ADEMA, G. & FIGDOR, C. **Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation.** Pharmacol Rev. (5)551-571, 2003.

WALLACH, D.; ARUMUGAM, T.U.; BOLDIN, M.P.; CANTARELLA, G.; GANESH, K.A.; GOLTSEV, Y.; GONCHAROV, T.M.; KOVALENKO, A.V.; RAIPUT, A.; VARFOLOMEEV, EE. & ZHANG, S.Q. How are the regulators regulated? **The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF-kappaB activation by members of the TNF/NGF receptor family.** Arthritis Res., 4:189-96, 2002.

WANG, X. **The expanding role of mitochondria in apoptosis.** Genes Dev., 15:2922-2933, 2001.

WONG, W.; GENTLE, I.; NACHBUR, U.; ANDERTON, H., VAUX, D. & SILKE, J. **RIPK1 is not essential for TNFR1-induced activation of NF-kb.** Cell Death and Differ., 17:482-487, 2010.

WORTHINGTON, M.; COHN, S.; MILER, S.; LUO, R. & BERG, L. **Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines.** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 280:1172-1177, 2001.

ZIEGLER, U. & GROSCURTH, P. **Morphological features of cell death.** News Physiol Sci.; 19:124-2, 2004.

ZHANG, N.; HARTIG, H.; DZHAGALOV, I.; DRAPER, D. & You Wen, H.E. **The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes.** Cell Research, 15(10):749-769, 2005.

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](#)