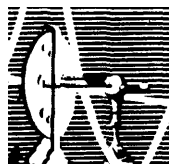


TATIANE DUARTE COZENDEY

“Participação da Heme oxigenase-1 na infecção de macrófagos pelo *Trypanosoma cruzi*: modulação pela fagocitose de células apoptóticas”

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Cozendey, Tatiane Duarte

**“Participação da Heme-oxigenase-1 na infecção de macrófagos pelo
Trypanosoma cruzi: modulação pela fagocitose de células apoptóticas**

UFRJ/IBCCF, 2010

Tese de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Departamento de Biofísica
Carlos Chagas Filho.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Doença de Chagas 3. Heme-oxigenase-1 4. Células apoptóticas
5. Produtos da degradação do Heme 6. Protoporfirinas IX

I. Freire-de-Lima, C.G.; Cozendey, T.D. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Tatiane Duarte Cozendey

“PARTICIPAÇÃO DA HEME OXIGENASE-1 NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADO COM *TRYPANOSOMA CRUZI*: MODULAÇÃO PELA FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS”

Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Biofísica).

Rio de Janeiro, dia 4 de maio de 2010.

Aprovada por:

Dr. Célio G. Freire de Lima - Professor Adjunto, UFRJ

Dr. Alexandre Morrot – Professor Adjunto, UFRJ

Dra. Christianne Bandeira Melo – Professora Adjunto, UFRJ

Dr. Marcelo Torres Bozza - Professor Associado, UFRJ

Dr. Pedro Muanis Persechini - Professor Titular, UFRJ

Dra. Valéria Matos Borges – Pesquisadora Adjunto, CPQGM - Fiocruz /BA

Dedico este trabalho aos meus pais Márcia e Elzio,
e à minha irmã Taiana, pelo amor incondicional.
Dedico também à Marise, pela amizade e por toda ajuda
concedida nas diferentes etapas de realização deste trabalho.

*"O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto;
a sabedoria é humilde por não saber mais."*

William Cowper

v

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me abençoado com uma família e amigos maravilhosos.

Aos meus pais Márcia e Elzio por permitirem que eu pudesse chegar até aqui, acima de tudo, pelo amor incondicional, carinho, pelos ensinamentos que me seguirão por toda a vida, pela atenção, preocupação e dedicação incansável. Amo vocês!

À minha irmã, Taiana pelo carinho, companheirismo, amizade, longas conversas, e que mesmo sem saber exerceu grande influência sobre mim, por sua força e determinação. Amo você!

À todos os meus familiares, pelo amor, carinho, confiança e fé depositadas em mim.

Ao Célio, pela orientação, pela confiança e pelos ensinamentos transmitidos nesses nesse tempo de convivência.

Ao professor George, por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos, e pelas críticas construtivas ao trabalho.

Ao professor Marcelo Bozza pela colaboração e por ter cedido gentilmente biliverdina e bilirrubina, enquanto nossos frascos não chegavam.

À Marise, pela confiança, pelas dicas importantes dadas ao longo desse trabalho, pelos ensinamentos, enfim, por poder contar sempre com sua ajuda, e acima de tudo pela amizade, companheirismo, pela enorme paciência, e pelo grande incentivo que me ajudou a chegar até aqui.

Aos amigos do Laboratório, Dr^a. Marcela Lopes, Fabrício, Alessandra, Alex, Natália, Ramade e Dayana, pelo agradável convívio e troca de idéias, e em especial a Ana Caroline, Landi, Marina e Wânia pela ajuda na interpretação dos ELISAs, pelo incentivo, pelo companheirismo, pelo apoio, e pela amizade que espero que perdure.

À Isabel, por ter tido a oportunidade de poder orientá-la mesmo que por pouco tempo, antes mesmo que o projeto fosse esse. Pela amizade, companheirismo, e por sua doçura de pessoa.

Ao Lindomar, à Jorgete, e a Aline, pela amizade, pelo convívio no laboratório, pela prestatividade, por toda ajuda e suporte, que foram indispensáveis para a realização desta tese.

A todos meus amigos, em especial a Geórgia Leal, Mácia Terra, Karina Kroll, Priscylla Mendonça, Sueli Bento e Tati Didonet por continuarem sendo as amigas verdadeiras de longa data, pelo apoio, pelas longas conversas e por estarem presentes em mais uma etapa da minha vida.

Aos professores da Pós-Graduação que contribuíram enormemente compartilhando seus conhecimentos, e possibilitando que abrissemos nossas mentes para nos tornamos pessoas mais questionadoras.

Enfim, a todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para esta fase de minha vida que agora estou concluindo.

RESUMO

COZENDEY, Tatiane Duarte. **Participação da Heme-oxigenase-1 na infecção de macrófagos pelo *Trypanosoma cruzi*: modulação pela fagocitose de células apoptóticas.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

As células apoptóticas são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos, evitando que seja desenvolvida uma resposta inflamatória. Previamente nosso grupo mostrou que existe intensa apoptose linfocitária em um modelo experimental da infecção da doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. No presente trabalho, demonstramos que existe uma regulação da enzima Heme oxigenase-1 (HO-1), uma proteína que cataboliza a molécula heme em biliverdina, ferro (Fe^{2+}) e monóxido de carbono (CO). Em nosso modelo, macrófagos murinos peritoneais de BALB/c infectados com *T. cruzi* foram co-cultivados na presença de células apoptóticas ou tratados com o indutor da HO-1 (cobalto protoporfirina-CoPPIX), exacerbou a replicação do *T. cruzi in vitro*. Além disso, a indução da HO-1 parece estar correlacionada com o aumento da produção de fatores anti-inflamatórios (TGF- β , IL-10 e PGE₂), e com a diminuição na produção de TNF- α e óxido nítrico (NO). Macrófagos peritoneais infectados quando colocados em co-cultura com células apoptóticas na presença do inibidor da HO-1 (estanho protoporfirina-SnPPIX), mostrou uma diminuição do número de parasitas e na produção de fatores anti-inflamatórios. Observamos também que a biliverdina e a bilirrubina, produtos da degradação da heme pela HO-1, agem de forma semelhante à HO-1. Recentemente foi sugerido que a HO-1 era transcricionalmente regulada pelo receptor de proliferação peroxissomo ativado isoforma gama (PPAR- γ). Avaliamos também a participação do antagonista PPAR- γ , GW9662, nas co-culturas de macrófagos peritonais infectados e células apoptóticas e com o indutor da HO-1. Nesse sistema, foi observada uma inibição no crescimento dos parasitas. Nossos resultados demonstram pela primeira vez, que a expressão da HO-1 por macrófagos, pode ser induzida pela fagocitose de células apoptóticas, e desta maneira modular o perfil de mediadores pró e anti-inflamatórios, resultando assim, no favorecimento da replicação de do *T. cruzi*.

Palavras-chave: *T. cruzi*, macrófagos, Heme oxigenase-1

ABSTRACT

COZENDEY, Tatiane Duarte. **Participação da Heme-oxigenase-1 na infecção de macrófagos pelo *Trypanosoma cruzi*: modulação pela fagocitose de células apoptóticas.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Apoptotic cells are rapidly recognized and engulfed by macrophages to avoid an inflammatory response. Previously our group have shown lymphocyte apoptosis in experimental model of Chagas' disease, an illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Here, we demonstrated an up-regulation of heme oxygenase-1 (HO-1), a protein that breaks down the porphyrin ring to yield equimolar amounts of biliverdin, free iron (Fe^{2+}) and carbon monoxide (CO). Peritoneal murine macrophages from BALB/c mice infected with *T. cruzi* were cocultured with apoptotic cells or with single treatment with HO-1 inducer (cobalt protoporphyrin-CoPPiX), is correlated with an increased replication of *T. cruzi in vitro*. Additionally, the induction of HO-1 favored the production of anti-inflammatory factors (TGF- β , IL-10 and PGE-2), and decreased production of pro-inflammatory factors such as TNF- α and nitric oxide (NO). Peritoneal murine infected macrophages co-cultured with apoptotic cells in the presence of the HO-1 inhibitor (tin-protoporphyrin IX-SnPPIX), showed a decrease in the number of parasites as well as in the production of anti-inflammatory molecules. We also observed that biverdin and bilirubin, products of heme degradation through HO-1, behaved as HO-1. Recently was suggested that HO-1 was transcriptionally regulated by Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- γ). We also evaluate the participation of PPAR- γ agonist, GW9662, in the cultures of infected peritoneal macrophages co-cultured with apoptotic cells and with HO-1 inducer. In this system we observed an inhibition of parasites growth. Our results suggest for the first time, that the expression of HO-1 by macrophages, can be induced by engulfment of apoptotic cells, and can modulate the production of pro and anti-inflammatory factors, resulting in the increase of *T. cruzi*.

Key-Words: *T. cruzi*, macrophages, Heme oxygenase-1

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Fig. 2: Estrutura do ferro protoporfirina IX (heme).....	17
Fig. 3: Esquema da reação de catalização da heme-oxigenase.....	18
Fig. 4: Biossíntese do heme.....	20
Fig. 5: A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos aumenta a expressão da enzima HO-1.....	37
Fig. 6: A indução da enzima HO-1 e as células apoptóticas exacerbam a replicação do <i>T. cruzi in vitro</i>	39
Fig. 7: HO-1 exacerbou a replicação da carga parasitária intracelular.....	41
Fig. 8: Produção de moléculas anti-inflamatórias induzida pela HO-1.....	44
Fig. 9: Avaliação da produção de TNF- α e NO induzida pela enzima HO-1.....	46
Fig. 10: A produção de TGF- β induzida pela HO-1 favorece o crescimento do <i>T. cruzi</i>	48
Fig. 11: A adição exógena de BV e BR também favorece o crescimento do <i>T. cruzi in vitro</i>	50
Fig. 12: Exarcebação da carga parasitária intracelular induzida por BV e BR.....	51
Fig. 13: A produção de TGF- γ é induzida por BV e BR	52
Fig. 14: Ausência de produção de TNF- α e NO na presença de BV e BR.....	53
Fig. 15: A neutralização do TGF- β permitiu a produção de TNF- α e NO por macrófagos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	54
Fig. 16: Efeito do antagonista do PPAR- γ , GW9662, sobre o crescimento do <i>T. cruzi in vitro</i>	56
Fig. 17: Modelo proposto	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK – Tampão para lise de hemácias

ALA-D – δ -Aminolevulinato desidratase

ALA-S - δ -Aminolevulinato sintase

BSA – Albumina sérica bovina

BHI – *Brain Heart Infusion* (Infusão de coração e cérebro)

BV – Biliverdina

BR – Bilirrubina

CO – Monóxido de carbono

CoPPIX – Cobalto protoporfirina

COX-2 – Cicloxigenase-2

CPO – Coproporfirinogênio III oxidase

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

FasL – Ligante de Fas

FC - Ferroquelatase

HBSS – Solução salina de Hanks

HO – Heme oxigenase

ICAM – Molécula de adesão intercellular-1

IFN- γ – Interferon-gama

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL- 4,6,10,12,13 – Interleucina 4,6,10,12,13

IL-1 β – Interleucina 1 beta

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1

MIP – Proteína inflamatória de macrófagos

NF- κ B – Fator nuclear de células T ativadas

NK – Células *Natural Killer*

NO – Óxido Nítrico

ODC – Ornitina descarboxilase

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfatos)

PGE2 – Prostaglandina E2

PPARs – *Peroxisome proliferator-activated receptors* (Receptores de proliferação peroxissomo ativado)

PPAR- γ – *Peroxisome proliferator-activated- γ* (Receptores de proliferação peroxissomo ativado isoforma gama)

PPIX – protoporfirina

ROS – Espécie reativa de oxigênio

SnPPIX – Estanho protoporfirina

TCR – Receptor de células T

TGF- β – *Transforming Growth Factor* (Fator de crescimento transformante- β)

Th1 – *T helper cell type I* (Célula T auxiliar tipo I)

Th2 – *T helper cell type II* (Célula T auxiliary tipo II)

TNF- α – Tumoral Necrosis Factor- α (Fator de Necrose Tumoral- α)

URO-D – Uroporfirinogênio III descarboxilase

URO-S – Uroporfirinogênio III sintase

VCAM – Molécula de adesão vascular-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 – Doença de Chagas.....	3
1.2 – Resposta Imune ao <i>T.cruzi</i>	7
1.3 - Apoptose	12
1.4 -Apoptose e doença de Chagas.....	14
1.5 – Heme-oxigenase-1 e heme	16
1.6 - HO-1 e inflamação	21
1.7 – HO-1 e doenças infecciosas	24
RACIONAL.....	28
2. OBJETIVO GERAL	30
2.1 - Objetivos Específicos	30
3. MATERIAL & MÉTODOS.....	31
3.1-Animais	31
3.2- Parasitos.....	31
3.3 - Obtenção de células apoptóticas	31
3.4 - Obtenção de macrófagos e avaliação da carga parasitária <i>in vitro</i>	32
3.6 – Reagentes	33
3.7 - Dosagens de citocinas por ELISA	34
3.8 - Dosagem de prostaglandina (PGE ₂) por ELISA.....	35
3.9 - Ensaio de produção de óxido nítrico (NO)	36
3.10- Ensaio de Western Blot.....	36
3.11 - Análise Estatística	37

4. RESULTADOS	38
4.1 - Indução da expressão da enzima HO-1 em macrófagos co-cultivados com células apoptóticas...	38
4.2 - Ativação da enzima HO-1 favorece a replicação do <i>T. cruzi in vitro</i>	39
4.3 – A atividade da HO-1 modula a produção de fatores anti-inflamatórios.....	42
4.4 – Avaliação da produção de TNF- α e NO induzida pela enzima HO-1.	45
4.5 – A produção do TGF- β pelo indutor da HO-1 favorece a replicação do <i>T. cruzi</i>	48
4.6 – Efeito dos subprodutos do heme, biliverdina e bilirrubina, na replicação do <i>T. cruzi</i> e na produção de moléculas pró e anti-inflamatórios.	50
4.7 - Envolvimento do PPAR- γ na ativação da HO-1	55
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES.....	66
MODELO PROPOSTO	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanosomíase Americana ou Tripanosomíase do Novo Mundo, é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909; Prata, 2001; WHO, 2002) e afeta de 500 milhões de pessoas por ano, em mais de 100 países, principalmente países da América Latina, incluindo o Brasil (WHO, 2010).

A descoberta da doença por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909 representou um marco importante na história da ciência porque foram descritas não só as manifestações clínicas (fase aguda e crônica), mas também o agente etiológico e seu ciclo evolutivo, o inseto vetor e a epidemiologia da doença (DIAS, 1988).

Dos três ciclos de transmissão vetorial do *T. cruzi*, o ciclo doméstico é o de maior importância epidemiológica, já que perpetua a infecção em seres humanos. O vetor cresce e multiplica-se em vários locais das residências com paredes de barro ou tijolo cru e telhados de palha ou junco (BARRETO, 1979). O principal vetor de transmissão é o inseto hematófago triatomíneo, pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, comumente conhecidos como “barbeiros”. Os principais gêneros de importância na transmissão são: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (MONCAYO, 2003; WHO, 2010).

A transmissão vetorial ocorre quando o inseto, ao alimentar-se do sangue do hospedeiro vertebrado, elimina através das fezes e da urina, as formas tripomastigotas metacíclicas, infectando assim, membranas mucosas ou microfissuras da pele (COURA *et al.*, 1994). Porém, a mudança na distribuição e no perfil migratório da população rural, fez com que a doença de

Chagas passasse a ter um caráter de infecção urbana, podendo ser transmitida por transfusões sanguíneas, o que passou a representar uma via importante de novos casos da doença, especialmente em grandes cidades (DIAS, *et al.*, 2002). A transmissão pode ainda ocorrer de forma congênita, transplante de órgãos e por acidentes de laboratório (MONCAYO, 1997). Uma outra forma de transmissão da doença é através da ingestão de alimentos contaminados, como por exemplo, o incidente que ocorreu no início de 2005 no município de Navegantes em Santa Catarina, onde indivíduos foram infectados pela ingestão de caldo de cana contendo formas tripomastigotas metacíclicos. Além deste episódio, outros relatos confirmaram a transmissão oral resultando em microepidemias no Pará, onde os triatomíneos eram triturados pelo equipamento utilizado para o preparo de suco de açaí (STEINDEL, DIAS & ROMANHA, 2005).

O *T. cruzi* é um parasito que apresenta um ciclo de vida complexo (Fig. 1), envolvendo vários estágios tanto em mamíferos como nos insetos hematófagos, denominados epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. As duas primeiras formas são alongadas e flageladas, enquanto a forma amastigota é ovóide e sem flagelo livre (STEINDEL *et al.*, 2005).

Durante o ciclo do parasito, os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam em epimastigotas no intestino do hospedeiro invertebrado. Os epimastigotas se dividem e dão origem aos tripomastigotas metacíclicos, forma que não se divide e que é altamente infectiva para o vertebrado (BURLEIGH & ANFREWS, 1995). Essa diferenciação de epimastigotas para a forma tripomastigota metacíclico pode ser mimetizada *in vitro* de acordo com o método de Contreras e colaboradores (1985). Os tripomastigotas metacíclicos diferenciados *in vitro* apresentam as mesmas características biológicas observadas nos parasitas oriundos do hospedeiro invertebrado (CONTRERAS *et al.*, 1988; LOPES *et al.*, 1995b).

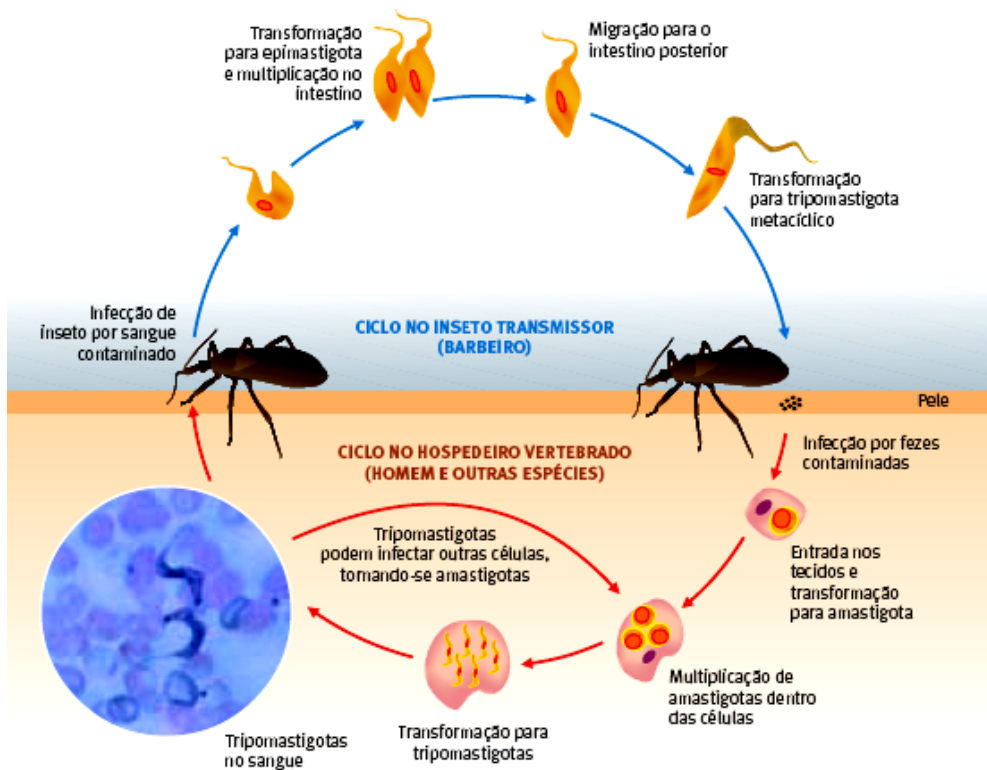


Figura 1: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* (Steindel *et al.*, 2005. *Ciência Hoje* 37: 32-38).

Os tripomastigotas infectam uma variedade de células do hospedeiro. Ao penetrarem nas células, estes são inicialmente observados nos vacúolos parasitóforos de onde escapam e se diferenciam em amastigotas no citoplasma da célula hospedeira. No citoplasma, as formas amastigotas se dividem por fissão binária e quando atingem uma determinada densidade, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que rompem a célula e, após serem liberados, invadem novas células ou caem na corrente sanguínea, de onde, eventualmente, são capturados pelo inseto, dando início a um novo ciclo (BRENER, 1982). Embora qualquer célula nucleada de mamífero possa ser parasitada pelo *T. cruzi*, esses parasitos apresentam preferência

por células reticuloendoteliais, nervosas, e musculares, principalmente o coração (revisto por TANOWITZ *et al.*, 2009). O inseto vetor ao se alimentar do sangue do hospedeiro infectado, ingere as formas tripomastigotas sanguíneas, que se transformam em epimastigota no intestino do inseto, e posteriormente se diferenciam na forma infectiva, não divisível, que são as tripomastigotas metacíclicas, fechando dessa forma o ciclo deste parasito (revisto por TANOWITZ *et al.*, 2009).

A doença de Chagas é uma enfermidade complexa que apresenta três fases: aguda, intermediária e crônica (revisto por PRATA *et al.*, 2001). Em áreas endêmicas, a fase aguda da doença atinge principalmente crianças e adolescentes. Essa fase caracteriza-se por febre variável, parasitemia patente, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia podendo ainda ser totalmente assintomática (revisto por PRATA *et al.*, 2001). Nessa fase os testes sorológicos podem revelar anticorpos IgM específicos para o *T. cruzi* (revisto por UMEZAWA *et al.*, 2000). A mortalidade de indivíduos na fase aguda da doença é extremamente rara e quando acontece está relacionada a danos cardíacos e/ou meningites e encefalites (revisto por TEIXEIRA *et al.*, 2006). Mesmo sem tratamento, a parasitemia normalmente regride devido ao surgimento de uma vigorosa resposta imune, envolvendo várias populações celulares, incluindo linfócitos B e T, macrófagos, e células NK (revisto por TARLETON, 2007).

Após a fase aguda, segue-se uma fase clínica denominada intermediária ou indeterminada, definida pela ausência de sintomas da doença de Chagas, mas com presença de anticorpo IgG específico e/ou demonstração parasitológica. Cerca de 10-30% das pessoas infectadas que passaram pela fase intermediária desenvolvem a fase crônica, após períodos de tempo que podem variar de poucos meses a décadas. Alguns pacientes podem apresentar quadros

clínicos típicos da fase crônica sintomática tais como alterações cardíaca, digestivas (megacólon e megaesôfago) e/ou neurológicas (UMEZAWA *et al.*, 2001).

Embora grande parte dos casos crônicos apresente uma evolução lenta e benigna (DIAS *et al.*, 1956) uma parcela significativa acaba por falecer devido a problemas cardiovasculares (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Na América Latina, a doença de Chagas representa a primeira causa de lesão cardíaca em jovens e adultos em idade economicamente produtiva (MONCAYO, 2003).

Com base nas evidências atuais da participação do parasita na patogenia da cardiopatia chagásica, tem-se dado ênfase à terapêutica parasiticida. A fase aguda é a ocasião onde o tratamento é realmente efetivo, sendo consenso de que o mesmo deve ser instituído nessa fase, uma vez que cerca de 50% a 70% dos pacientes podem ser efetivamente curados (revisto por DIAS, 1999; revisto por BRENER, 2000). O único parasiticida atualmente no mercado é o benzonidazol (BNZ), já que o nifurtimox (NFX) está fora do mercado brasileiro devido à sua alta toxicidade. Além da fase aguda, o BNZ é utilizado em pacientes imunossuprimidos (AIDS) com reativação parasitária, e em pré- operatório para transplantes cardíacos. Na fase crônica da doença o mesmo não é eficiente, portanto não utilizado (revisto por BRENER, 2000).

A insuficiência cardíaca chagásica é tratada de acordo com as regras desta síndrome, isto é, restrição de sódio e uso de diuréticos e digitálicos. O transplante de coração, apesar da reativação e possibilidade de neoplasias e rejeição, tem demonstrado benefícios aos pacientes chagásicos crônicos quando comparado com outras cardiopatias (revisto por PRATA, 2001).

1.2 – Resposta Imune ao *T.cruzi*

Diferentes aspectos da doença de Chagas humana podem ser reproduzidos em diferentes animais de laboratório. Nas últimas décadas, a melhor compreensão da resposta imunológica em

animais experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* está relacionada com a utilização de diferentes linhagens de camundongos. Como consequência do seu uso intenso, os resultados obtidos com o modelo murino representam hoje a mais detalhada descrição celular, molecular e fenomenológica disponível para o sistema imune de mamíferos. Com relação à doença de Chagas, o estudo histopatológico sistemático realizado em diferentes linhagens de camundongos infectadas pelo *T. cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco. Essas características, aliadas a grande disponibilidade de ferramentas biotecnológicas de análise, tornaram o camundongo o modelo experimental mais explorado para o estudo da resposta imune ao *T. cruzi* (LOPES & DOSREIS, 2000).

Estudos realizados com modelo murino de infecção pelo *T. cruzi* têm demonstrado que os mecanismos humorais e celulares das respostas imunes, inata e adquirida são importantes para o controle dessa infecção e redução da parasitemia na fase aguda (ANDRADE, 1991; BERNER, 1994).

A migração de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos, estimulado pela presença do *T. cruzi*, inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (KRETTI & BRENER, 1982; ALIBERTI *et al.*, 1996). A produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12), pelos macrófagos ativados induzem de maneira sinérgica a produção de interferon-gama (IFN- γ) pelas células “natural killer” (NK). Este juntamente com o TNF- α , ativa a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos e a produção de NO com atividade tóxica sobre o *T. cruzi*, resultando na inibição da replicação intracelular (ALIBERTI *et al.*, 1996; MUÑOZ-FERNANDEZ & FRESNO, 1992; OSWALD *et al.*, 1992; TARLETON, 1988).

Devido aos efeitos antagônicos de algumas citocinas no processo imunológico, há várias evidências de que a resposta imune inata ao *T. cruzi* se auto-regula, reduzindo a ativação dos macrófagos e a produção local de NO. Ensaios *in vitro*, demonstram que a IL-10 e o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β) inibem a produção de NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1992). A produção de IL-10 é necessária para neutralizar os efeitos inflamatórios das citocinas do tipo 1 produzidas durante a infecção, reduzindo a toxicidade da própria resposta imune do hospedeiro (HUNTER *et al.*, 1997) e tem sido considerada um importante modulador das funções dos macrófagos contra o *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 1992). Estudo realizado *in vivo* mostrou que a administração de TGF- β recombinante durante o curso da infecção em camundongos B6D2, naturalmente resistentes à infecção com clone C2 da cepa Tulahuen do *T. cruzi*, tornaram-se suscetíveis, com aumento da parasitemia e mortalidade (SILVA, TWARDZIK & REED, 1991).

Dados recentes da literatura mostram que macrófagos podem ser fenotipicamente polarizados pelo microambiente dando origem a programas funcionais específicos. Essa polarização pode ser classificada amplamente em dois grupos principais: macrófagos classicamente ativados (ou M1), nos quais os estímulos de ativação são IFN- γ e LPS, e o macrófagos ativados alternativamente (ou M2) quando tratados com IL-4 (STEIN *et al.*, 1992; GORDON, 2003). Posteriormente os macrófagos do tipo M2 foram subdivididos em M2a (após exposição a IL-4 ou IL-13), e M2b (quando expostos a complexos imunes em combinação com IL-1 β ou LPS) e M2c (tratados com de IL-10, TGF- β ou glucocorticóides). Os macrófagos M1 exibem potentes propriedades microbidas e promovem uma forte resposta Th1 mediada por IL-12, enquanto os macrófagos M2 estão implicados com as funções efetoras associadas à resposta Th2 (MARTINEZ *et al.*, 2008). Todos esses tipos de macrófagos podem ser encontrados em diversas condições como nas

respostas imunes a diferentes patógenos, tumores e doenças autoimunes (revisado por STEMPIN *et al.*, 2010). Durante a infecção com parasitos como *Leishmania*, *Plasmodium* e *T. cruzi*, uma resposta pró-inflamatória dependente de IFN- γ dá origem ao desenvolvimento de macrófagos classicamente ativados necessários para o controle da parasitemia, especialmente durante a fase aguda da infecção. Fatores como IL-10, TGF- β (GORDON, 2003) e a fagocitose de células apoptóticas (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000), exercem efeito antagônico em macrófagos classicamente ativados, induzindo a ativação alternativa e desativação de macrófagos. Além dessas, citocinas como IL-4 e IL-13 também desempenham um efeito antagônico em macrófagos classicamente ativados, induzindo a expressão de arginase-1 nessas células. A expressão de arginase-1 induz uma alteração no metabolismo da arginina, dando origem a L-ornitina, precursora de poliaminas. Na infecção pelo *T. cruzi* a atividade da arginase-1 não é necessariamente induzida por IL-4. Foi demonstrado que a cruzipaína, um antígeno do *T. cruzi*, induz a expressão dessa enzima em células J774 e o pré-tratamento dessas células com um inibidor da arginase, o N-omega-hidroxi-L-arginina resulta numa diminuição acentuada na replicação de amastigotas (STEMPIN *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* mostraram que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, mediada pelo receptor de vitronectina desencadeou a cascata bioquímica envolvendo a produção de PGE2 e TGF- β . A geração de poliaminas, como putrescina, catalizada pela enzima ornitina decarboxilase (ODC), resultou na exacerbação da replicação do *T. cruzi in vitro* (LOPES *et al.*, 2000).

Vários estudos demonstraram que células T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham um papel crucial ao *T. cruzi*, reduzindo os níveis de parasitemia e mortalidade em camundongos infectados com o parasita. A depleção de quaisquer dessas sub-populações de linfócitos T promove o aumento da susceptibilidade à infecção (TARLETON, 1995; TARLETON, 1996; KUMAR &

TARLETON, 1998). Camundongos deficientes de células T CD4⁺, obtidos por mutação dos genes que codificam as moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON *et al.*, 1996). Segundo os autores a presença dos linfócitos T CD4⁺ seriam importantes não só para auxiliar as células B a produzirem anticorpos protetores, mas também para promover a atividade tripanicida dos macrófagos.

O *T. cruzi* é capaz de invadir e se multiplicar dentro de uma grande variedade de células. Uma vez dentro das células, os parasitos escapam do fagolisossoma e se multiplicam no citoplasma. Essa localização favorece o processamento das proteínas do parasito e apresentação por moléculas de MHC de classe I que pode ser reconhecido por células T CD8⁺ efectoras (TARLETON *et al.*, 1996). Estudos realizados com camundongos deficientes para o gene $\beta 2$ microglobulina, e portanto, desprovidos de resposta de célula T CD8⁺, se mostraram mais susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* do que os animais controles (TARLETON *et al.*, 1996). Outro estudo, onde foram utilizados camundongos deficientes de ambas sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, mostrou que os animais são ainda mais susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*, apresentando intenso parasitismo tecidual e ausência de inflamação nos tecidos (TARLETON *et al.*, 1996).

A fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* é caracterizada por uma imunossupressão e por uma intensa ativação policlonal de linfócitos T e B *in vivo*, que parece não estar relacionada aos antígenos do parasito. Linfócitos T obtidos de camundongos na fase aguda da infecção são incapazes de proliferar em resposta a mitógenos como a concanavalina A (Con-A) e a anticorpos monoclonais anti-Thy 1, assim como a antígenos do próprio parasito (revisto por MINOPRIO *et al.*, 1989; DE OLIVEIRA, 1991).

Inúmeros trabalhos mostraram que essa supressão da resposta imune na fase aguda se deve a uma redução na secreção de IL-2 (HAREL-BELLAN, 1983; TARLETON, 1988b) e na deficiência da expressão do receptor para IL-2 (IL-2R) (BELTZ, SZTEIN & KIERSZENBAUM, 1988; KIERSZENBAUM *et al.*, 1991). Apesar de ser uma característica central na infecção pelo *T. cruzi*, o déficit na produção de IL-2 não explica a baixa resposta proliferativa dos linfócitos T, uma vez que a adição de IL-2 exógena recupera apenas parcialmente a resposta (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995; HAREL-BELLAN *et al.*, 1985).

Foi sugerido que outros processos podem estar envolvidos na imunossupressão observada na infecção pelo *T. cruzi*, como a anergia de células T (SOONG & TARLETON, 1992) e/ou um defeito intrínseco no processo de ativação de linfócitos T CD4⁺, que levaria a apoptose linfocitária.

1.3 - Apoptose

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental (LOCKSHIN & WILLIAMS, 1964). Em 1972, Keer e colaboradores, sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular (KERR *et al.*, 1972). A apoptose está envolvida em diversos processos biológicos, como no desenvolvimento, diferenciação, proliferação/homeostase, regulação e função do sistema imune e na remoção de células defeituosas. Alterações no processo de apoptose podem dar origem a diversas patologias, como por exemplo, neoplasias, doenças autoimunes e desordens neurodegenerativas (GEWIES, 2003).

De forma geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre retração da célula causando a perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas

celulares mantêm a sua morfologia, com exceção das mitocôndrias que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos “*blebs*” e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho, e se rompem, originando os corpos apoptóticos. Uma característica marcante da morte por apoptose é a interiorização das células apoptóticas, por macrófagos e células dendríticas imaturas, mas também por outros fagócitos não profissionais, incluindo fibroblastos e células endoteliais, epiteliais, e células do tecido muscular liso. A fagocitose das células apoptóticas nos tecidos é rápida, eficiente, e protege os tecidos dos efeitos danosos do conteúdo intracelular liberado (FADOK *et al.*, 1992; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004; PLATT *et al.*, 1998; VANDIVIER *et al.*, 2006). A deficiência no reconhecimento ou remoção dessas células tem como consequência a necrose secundária ou citólise pós-apoptótica com liberação de constituintes de células para os tecidos, que são pró-inflamatórios e pró-imunogênicos (SCOTT, 2001).

A eliminação eficiente de uma célula apoptótica pode ser dividida em várias etapas: contato entre a célula apoptótica e o fagócito; reconhecimento específico; fagocitose da célula alvo, e finalmente a degradação intracelular da célula apoptótica fagocitada. Esses processos estão intimamente associados com a liberação de citocinas anti-inflamatórias e indução de tolerância ao próprio. Nas etapas de contato e reconhecimento, estão envolvidos três tipos de sinais. O sinal “Encontre-me” (Find me signal) são fatores solúveis que induzem a migração dos fagócitos até onde estão localizadas as células apoptóticas. Várias moléculas foram identificadas como candidatas em potencial para essa função. Algumas delas foram caracterizadas, tais como as lisofosfatidilcolinas e a quimiocina quimioatrativa de monócitos, MCP-1 (revisto por

NAGAOSA, 2003). O segundo sinal, “Fagocite-me” (Eat-me signal), são moléculas que estão expostas na superfície da célula apoptótica, como a fosfatidilserina (PS) – um fosfolípido normalmente limitado à parte interna da membrana plasmática, que são rapidamente reconhecidas pelos fagócitos (FADOK *et al.*, 1992; SAVILL, *et al.*, 2003). Nos últimos 20 anos, outras moléculas presentes nas células apoptóticas ou liberadas por elas, têm sido relacionadas com o processo de fagocitose como ligantes de carboidratos (por exemplo, aminoaçúcares ou manose), lisofosfolípidios, entre outras (GARDAI *et al.*, 2006). Células viáveis, que não apresentam sinais para os fagócitos, expressam em sua superfície, moléculas que inibem o processo de fagocitose. Essas moléculas são conhecidas como “não fagocite-me” (don’t eat me signal). O CD47, que é uma proteína associada a uma integrina, amplamente distribuída nas células viáveis, é uma dessas moléculas (GUIMONT-DESROCHERS, 2009; revisto por PAIDASSI *et al.*, 2009).

A morte celular por apoptose desempenha papel determinante na homeostasia do sistema imune, onde os processos geradores da resposta imune à patógenos e/ou antígenos, precisam ser rigorosamente controlados, e muitas vezes extintos, sob pena de efeitos deletérios, irreversíveis ao hospedeiro. Alguns autores tem se dedicado ao estudo da apoptose na resposta imune causada pela interação de parasitos intracelulares e as células do hospedeiro.

1.4 -Apoptose e doença de Chagas

Em 1995, Lopes e colaboradores descreveram, pela primeira vez numa doença parasitária, a morte induzida por ativação de células T CD4⁺ (Activation induced cell death - AICD) por apoptose, na doença de Chagas experimental. Os autores verificaram que células T CD4⁺ provenientes de baço de camundongos infectados com formas metacíclicas do clone

Dm28c do *T. cruzi* induzidas *in vitro* eram incapazes de responder a estimulação via TCR/CD3 e morriam por apoptose *in vitro* e que a adição de IL-2 recombinante exacerbou a AICD das células (LOPES *et al.*, 1995). Esse mesmo grupo mostrou que a indução de apoptose contribuiu diretamente para a supressão das respostas proliferativas de células T CD4⁺ de animais infectados, sugerindo, que a morte celular de células T maduras após a ativação policlonal dos linfócitos, poderia ser responsável pela imunossupressão observada durante o curso da infecção (LOPES & DOSREIS, 1996). Nunes e colaboradores investigaram o impacto da apoptose de linfócitos T na replicação do *Trypanosoma cruzi in vitro*. Quando macrófagos peritoneais de camundongos normais foram infectados e co-cultivados com células T CD4⁺ de camundongos, e estimulados com anti-TCR, foi constatado um aumento significativo dos parasitas, sugerindo um papel deletério da AICD na infecção pelo *T. cruzi*. Utilizando-se o mesmo sistema de co-cultura de macrófagos peritoneais infectados com células T, verificou-se que quando as células T CD4⁺ eram provenientes de camundongos *gld*, não foi observado crescimento acentuado de parasitas em macrófagos de camundongos BALB/c normais (LOPES *et al.*, 1999). Foi demonstrado também, que moléculas do próprio parasita, como a trans-sialidase, e HSP70, podem induzir apoptose de linfócitos do hospedeiro (revisto por LOPES & DOSREIS, 2000).

Outro modelo utilizado para investigar os efeitos da apoptose na infecção pelo *T. cruzi* consistiu na exposição de macrófagos infectados à células T necróticas e apoptóticas. Neste modelo, a presença de células apoptóticas exerceu o crescimento do parasita (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). O mecanismo envolvido foi relacionado aos efeitos supressivos das células apoptóticas sobre a atividade pró-inflamatória dos fagócitos com produção da prostaglandina E2 (PGE₂) e de TGF-β (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). A secreção de TGF-β induz a atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) nos macrófagos com conseqüente síntese de poliaminas,

principalmente putrescina, um metabólito que influencia a replicação do *T. cruzi* e na inibição da produção de óxido nítrico (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000).

Os dados mencionados acima, mostram a importância da apoptose na doença de Chagas, sugerindo que esse processo pode ser determinante na imunopatogênese da infecção.

Determinados parasitos contém hemoproteínas ou necessitam de compostos do heme durante o seu ciclo de vida. O *T. cruzi* é incapaz de sintetizar heme, mas precisa dessa molécula para o seu crescimento (CICCARELLI, *et al.*, 2007). Os triatomíneos, insetos vetores responsáveis pela infecção pelo *T. cruzi*, ao se alimentarem no hospedeiro invertebrado ingerem sangue para satisfazer sua necessidade nutricional (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ *et al.*, 1982). Uma vez no inseto vetor, esses parasitos se multiplicam e se diferenciam em seu intestino que, por conter sangue é muito rico em moléculas de heme, derivado da hemoglobina.

1.5 – Heme-oxigenase-1 e heme

A molécula Heme (ferro protoporfirina IX) é um complexo formado pelo átomo de ferro ligado por quatro grupos de porfirinas (revisto por WAGENER *et al.*, 2003). Sua estrutura foi confirmada por Hans Fisher, após sua síntese orgânica completa (WATSON, 1965) (Fig.2).

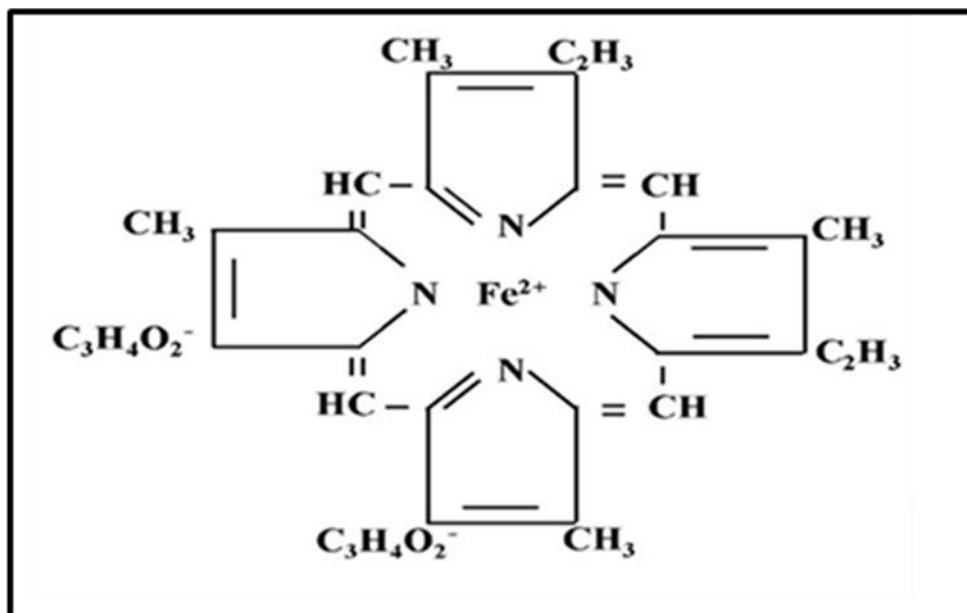


Figura 2: Estrutura do ferro protoporfirina IX (heme) (WAGENER *et al.*, 2003).

O heme é sintetizado por todas as células humanas nucleadas a partir de glicina e succinil-CoA, e envolve uma série de reações enzimáticas que ocorrem em parte na mitocôndria e em parte no citoplasma (Fig.3). A necessidade do heme, varia significativamente entre os diferentes tipos celulares e tecidos. A síntese do heme em grandes quantidades, ocorre rapidamente, principalmente nas células eritróides na medula óssea, nos hepatócitos do fígado, e em células macrofágicas do baço, uma vez que, a incorporação do heme nas hemoproteínas, como a hemoglobina, mioglobina e o citocromo P450, ocorre nesses órgãos (revisto por WAGENER *et al.*, 2003).

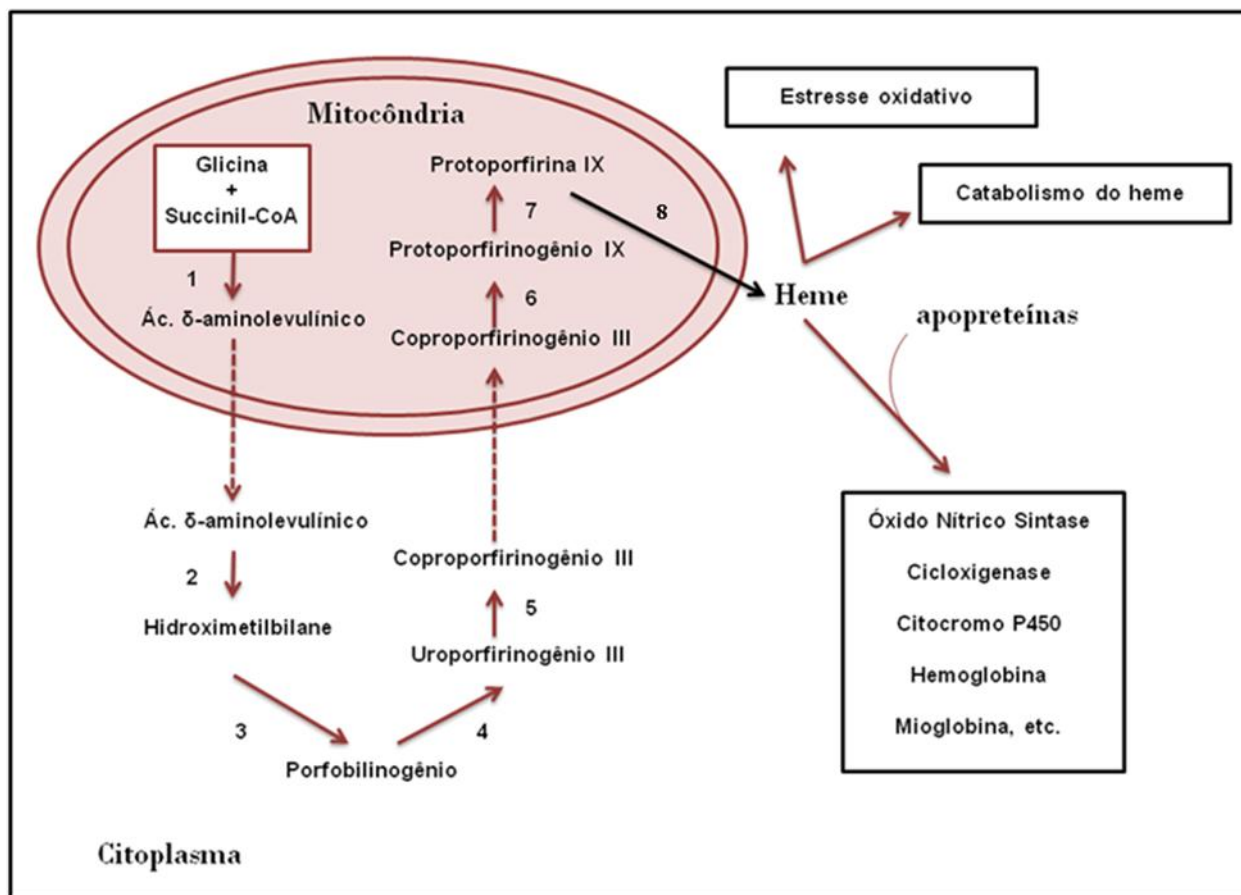


Figura 3: Biossíntese do heme. A formação do heme a partir da glicina e succinil-CoA envolve a participação seqüencial de oito enzimas diferentes: (1) δ -aminolevulinato sintase (ALA-S); (2) δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D); (3) porfobilinogênio deaminase (PBGD); (4) uroporfirinogênio II sintase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

O heme está envolvido numa variedade de funções biológicas. Essa molécula pode interagir com várias proteínas inativas originando a proteína heme funcional. Em última análise, a função da molécula heme, é determinada pelas propriedades das cadeias polipeptídicas ligadas a ela. Na hemoglobina e na mioglobulina, o heme é utilizado para o transporte e estocagem de oxigênio, respectivamente, enquanto no citocromo, o heme está envolvido no transporte de

elétrons, geração de energia e transformação química. Em enzimas como catalases e peroxidases, o heme funciona inativando ou ativando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), respectivamente, e no triptofano pirolase, o heme catalisa a oxidação do triptofano. Além disso, o heme é indispensável para uma variedade de outras sínteses enzimáticas importantes, como a da cicloxigenase (COX) e óxido nítrico sintase (NOS) (SEED & WILLOUGHBY, 1997; revisto por WAGENER *et al.*, 2003).

A molécula heme também está envolvida em vários processos celulares como diferenciação e proliferação celular, e modulação gênica (ABRAHAM *et al.*, 1983; BERI & CHANDRA, 1993; SASSA & NAGAI, 1996; PONKA, 1999). Em relação à diferenciação e proliferação celular, o heme estimula a diferenciação de neuroblastoma de camundongos, a diferenciação de fibroblastos 3T3 em adipócitos e estimula a proliferação de fibroblasto *in vitro*, entre outros (CHEN & LONDON, 1981). No que se refere à modulação gênica em células não eritróides, o heme regula a sua própria produção pela diminuição de sua biossíntese e pelo aumento do seu metabolismo. O heme controla a expressão de várias proteínas como as globinas, enzimas biosintéticas do heme, citocromos, mieloperoxidase, receptor de transferrina, e heme oxigenase-1 (HO-1) (GIDARI & LEVERE, 1977).

Vários trabalhos descreveram a interação da enzima Heme oxigenase-1 (HO-1) com a molécula heme (WAGENER *et al.*, 2003). Existem evidências de que o heme esteja envolvido na regulação de inúmeros processos fisiológicos e patológicos, como citoproteção, apoptose, e inflamação (revisto por MAINES, 1997; revisto por GOZZELINO *et al.*, 2010). No que diz respeito à inflamação, o recrutamento de leucócitos para os tecidos vasculares depende de inúmeras moléculas, como moléculas de adesão proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α) bem como, E- P- L-selectinas (WAGENER *et al.*,

1997; WAGENER *et al.*, 1999) e induzindo a migração de leucócitos, especialmente de neutrófilos. (PORTO *et al.*, 2007).

O metabolismo do heme está intimamente relacionada com a HO-1, que é uma enzima microsomal (MORSE & GHOI, 2005) que cataboliza a molécula heme recém sintetizada ou derivada das hemoproteínas, em quantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro (Fe^{2+}) (DESHANE *et al.*, 2005). Em mamíferos, a biliverdina (BV) é rapidamente convertida pela biliverdina redutase em bilirrubina (BR) (revisito por MAINES, 1997) (Fig. 4).

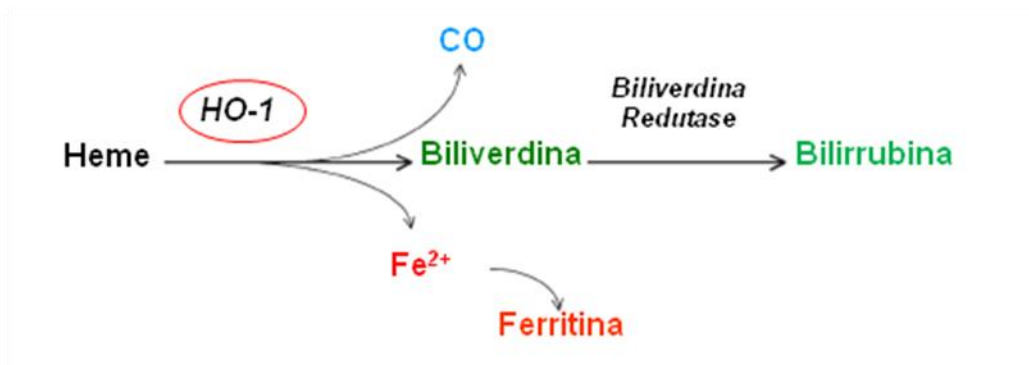


Figura 4: Esquema da reação de catalização da heme-oxigenase (Adaptado de MORSE & GHOI, 2005).

O monóxido de carbono (CO), um dos produtos da degradação do heme pela HO-1, desempenha várias funções biológicas. Entre elas podemos citar a citoprotetora e anti-inflamatória, proteção contra injúria oxidativa, e inibição da proliferação celular. Algumas atividades do CO são dependentes da via guanosina monofosfato cíclico (GMPc), como a inibição da agregação plaquetária e o relaxamento do músculo liso (CAO *et al.*, 2008). Outros efeitos mediados pelo CO, são independentes do GMPc, e envolvem a cascata de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (MORSE & CHOI, 2005). O íon Fe^{2+} , outro produto derivado do metabolismo do heme pela ação da HO-1, aumenta a síntese de ferritina, que é uma proteína seqüestradora de ferro e têm propriedade citoprotetora. Na ausência de HO-1, a

liberação de ferro pelas células pode estar diminuída, contribuindo para a morte celular (MORSE & CHOI, 2005). No que se refere a BV, essa desempenha importante função anti-oxidante (CHUNG *et al.*, 2009).

A heme oxigenase é a isoforma indutível e está inserida dentro do grupo das proteínas de choque térmico (SHIBAHARA *et al.*, 1987).

Até o momento foram descritas três isoformas da enzima HO (HO-1, HO-2, e HO-3), essas três isoformas são produtos de diferentes genes (MAINES, 1998). A isoforma HO-1, uma proteína de 32-kDa, diferentemente das outras duas, é induzida e pode ser detectada em diferentes tecidos. A isoforma HO-2 é constitutivamente expressa, possui peso molecular de 36-kDa, e está presente em altos níveis no cérebro, testículos e células endoteliais. A isoforma HO-3 possui peso molecular de 33-kDa e está presente em diferentes órgãos (MAINES, 1998).

Diferente das características observadas nas isoformas HO-2 e HO-3, a HO-1 pode ser fortemente induzida em resposta a diversos estímulos oxidativos, incluindo a degradação do heme (ALAM *et al.*, 1989), proteínas de choque térmico (STRUCHMANN, 2000), irradiação UV (LAVROVSKY *et al.*, 1994), óxido nítrico (FORESTI *et al.*, 1997), citocinas inflamatórias (TERRY *et al.*, 1998), mediadores lipídicos (JOZKOWICZ *et al.*, 2002) e metais pesados (ALAM *et al.*, 1989). Esta enzima também pode ser induzida por hipóxia, mas este efeito parece ser tecido e espécie dependente (MOTTERLINI *et al.*, 2000; SHIBAHARA *et al.*, 2003). Somente em alguns poucos tipos celulares a isoforma HO-1 pode ser constitutivamente expressa, entre elas as células T regulatórias CD4⁺/CD25⁺ (PAE *et al.*, 2003).

1.6 - HO-1 e inflamação

Dados da literatura mostram que a indução da HO-1 protege o tecido e células contra estresse oxidativo, inflamação, rejeição a transplantes, apoptose, e inibe a proliferação celular (BROUARD *et al.*, 2000; OTTERBEIN *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 2003). O aumento da expressão da HO-1 melhora a inflamação, através da sua capacidade de inibir a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e adesão de leucócitos *in vitro* e *in vivo*. Em contraste, a inibição da HO-1 aumenta a expressão de moléculas de adesão. (WILLIS *et al.*, 1996).

O efeito benéfico e modulador da HO-1 na inflamação foi descrita primeiramente por Willis e colaboradores (1996), no modelo de inflamação pleural. Nesse modelo, a inibição da HO-1 pela estanho-protoporfirina (SnPPIX), aumentou o infiltrado inflamatório. Por outro lado, a indução da HO-1 com a hemina resultou na redução da inflamação. Camundongos nocauteados e crianças deficientes da enzima HO-1 exibem fenótipo pró-inflamatório, confirmando, mais uma vez a importância dessa enzima no processo inflamatório (POSS & TONEGAWA, 1999; YACHIE *et al.*, 1999; KAPTURCZAK *et al.*, 2004). Por outro lado, a super-expressão da HO-1 leva a produção de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, que além de conferir proteção no modelo murino de sepse, também induz o aumento da sua própria expressão (LEE & CHAU, 2002).

A indução da enzima HO-1 inibe a inflamação, porém, mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, LPS, são potentes indutores da expressão da HO-1 em células endoteliais e macrófagos (CAMHI *et al.*, 1998; TERRY *et al.*, 1999; WAGENER *et al.*, 2003; KUNSCH, 2004). Moléculas de adesão que são componentes chaves para a inflamação como molécula de adesão celular-1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e selectinas são desativadas por indutores da HO-1 (WAGENER *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2004).

Necrose e apoptose podem ocorrer sob condições oxidativas e inflamatórias, o que resulta na liberação de grande quantidade de heme, e conseqüentemente na exacerbação do processo inflamatório e injúria celular. O mecanismo pelo qual a HO-1 protege as células da apoptose ainda não está claro. Brouard e colaboradores (2002), mostraram que a capacidade da HO-1 ou CO de proteger células endoteliais, da apoptose mediada por TNF- α é dependente da ativação do fator de transcrição NF κ -B. A ativação desse fator de transcrição promove a expressão de uma série de genes anti-apoptóticos, como por exemplo, c-IAP2 e A1, que interagem funcionalmente com CO para prevenir a apoptose de células endoteliais (BROUARD *et al.*, 2002).

Weis e colaboradores (2009) mostraram que o cultivo de macrófagos humanos com o lipídio bioativo esfingosina-1 fosfato, liberado por células apoptóticas, induziu o aumento da expressão da enzima HO-1, que por sua vez desencadeou sinais anti-apoptóticos como Bcl-2/Bcl-X_L, assim como de sinais anti-inflamatórios (WEIS *et al.*, 2009).

Recentemente, foi sugerido que a expressão da HO-1 pode ser regulada transcricionalmente pelo receptor de proliferação de peroxissomo ativado isoforma gama (Peroxisome proliferator activated receptor gamma – PPAR- γ) (KRONKE *et al.*, 2007). O PPAR- γ pertence a uma superfamília de receptores nucleares (ZHANG & YOUNG, 2002) e sua principal atividade biológica melhor descrita está relacionada com a regulação do metabolismo lipídico. Esses receptores podem ser expressos em macrófagos, células dendríticas, células T, B, endoteliais, entre outras, onde desempenham papel nos processos inflamatórios e imunológicos (ISSEMAN & GREEN, 1990; WAHLI & BRAISSANT, 1995; GLASS & OGAWAMA, 2006).

A ativação do PPAR- γ através do reconhecimento de células apoptóticas direciona os macrófagos para um perfil anti-inflamatório (JOHANN *et al.*, 2006). Recentemente foi

observado que a expressão da HO-1 pode ser regulada pela ativação do PPAR γ em células vasculares humanas, indicando um mecanismo anti-inflamatório desses ligantes de PPAR (KRONKE *et al.*, 2007). Devido ao seu papel anti-inflamatório, foi sugerido que esses ligantes podem ser utilizados como uma nova estratégia para terapia de doenças cardiovasculares, e no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (KRONKE *et al.*, 2007).

1.7 – HO-1 e doenças infecciosas

O envolvimento da HO-1 nas doenças infecciosas ainda não está bem esclarecido. Nos últimos anos, esse assunto vem sendo despertado o interesse de alguns grupos, mas ainda existem poucos dados na literatura.

O modelo experimental mais explorado é o da malária. Entre os resultados mais relevantes podemos citar os achados de Pamplona e colaboradores (2007), que usando camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, verificaram que o aumento da expressão e atividade da HO-1 evitou o desenvolvimento da malária cerebral experimental. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado em camundongos C57BL/6, onde 100% dos animais infectados desenvolveram malária cerebral experimental, devido a menor expressão de HO-1 (PLAMPLONA *et al.*, 2007).

Ainda em relação à participação da HO-1 no modelo experimental da malária foi observado que a expressão da HO-1 estava aumentada no fígado de camundongos infectados com esporozoítos de *Plasmodium berguei* ANKA e *Plasmodium yoelii*, o que ocasionou aumento da carga parasitária hepática. Camundongos deficientes da enzima HO-1 foram capazes de controlar a infecção, uma vez que na ausência da HO-1 foi observado um aumento da secreção de citocinas inflamatórias (EPIPHANIO *et al.*, 2008).

O envolvimento da HO-1 na tuberculose foi caracterizado recentemente. Já foi descrito, que uma das características mais importantes do patógeno causador da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), é sua capacidade de permanecer viável no hospedeiro humano por longos períodos em estado de latência, quando não se observam manifestações clínicas que permitam sua identificação. Nesta fase da infecção, o bacilo da tuberculose, diminui drasticamente seu metabolismo e praticamente não se multiplica como consequência da resposta imune montada pelo hospedeiro para tentar erradicar a infecção (DUCATI *et al.*, 2006). Este fato está relacionado com a expressão de vários genes conhecidos como “genes de dormência”, pelo MTB. Recentemente, foi mostrado que a HO-1 é induzida em macrófagos infectados com MTB tanto *ex vivo* quanto *in vivo*. Para confirmar se a HO-1 estava relacionada com o efeito dos “genes de dormência”, macrófagos deficientes para HO-1 quando infectados pelo MTB acarretaram uma redução desses genes. Os resultados de estudos desse grupo sugerem o que estabelecimento da infecção latente por esse microrganismo desencadeia a resposta imune do hospedeiro, que resulta na indução de HO-1, iNOS e formação de granuloma. Consequentemente, o MTB é exposto ao CO derivado da HO-1, ao NO derivado da iNOS e a baixos níveis de oxigênio nos granulomas o que leva a ativação dos “genes de dormência” o que pode permitir a sobrevivência da bactéria (KUMAR *et al.*, 2008; SHILOH *et al.*, 2008).

A HO-1 também desempenha um papel no modelo de sepse, como descrito recentemente por Chung e colaboradores (2008). O grupo demonstrou que durante a sepse, o CO derivado da HO-1 desempenhou um importante papel no processo antimicrobiano sem inibir a resposta inflamatória. Camundongos deficientes em HO-1 quando expostos ao modelo de ligadura e punção do ceco, que dá origem a um foco de infecção polimicrobiana na cavidade abdominal,

apresentaram um aumento na mortalidade comparado com os camundongos selvagens, (CHUNG *et al.*, 2008).

Assim como o trabalho citado acima, Takaki e colaboradores também verificaram o efeito benéfico da HO-1 na sepse. A correlação entre o nível de CO e a sobrevivência, está relacionada com o efeito benéfico causado pelo aumento da enzima HO-1 em pacientes com sepse severa (TAKAKI *et al.*, 2010).

No que diz respeito aos tripanosomatídeos, foi demonstrado, que infecção por *Leishmania mexicana pifanoi*, induz o aumento da expressão da enzima HO-1. Infecção com amastigota realizada na presença de metaloprotoporfirinas, inibidoras da HO-1, resultou na produção de superóxido por macrófagos infectados. Dessa maneira, a forma amastigota não apenas evita a produção de superóxido durante sua internalização pelos macrófagos, como também faz com que estas células se tornem refratárias a produção de superóxido. Dessa forma, o aumento da HO-1 favoreceu a infecção pela *Leishmania*, e o efeito observado no metabolismo do heme, pode ser utilizado como mecanismo de escape empregado por outros organismos (PHAM *et al.*, 2005).

Sendo assim, a enzima HO-1 parece ora favorecer o agente infeccioso, ora favorecer o hospedeiro, variando o microrganismo observado.

RACIONAL

Na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, já está bem estabelecido que os compostos derivados do heme são necessários para o crescimento do parasito *in vitro*. Essa necessidade nutricional se deve à incapacidade do *T. cruzi* em sintetizar a molécula heme (CICCARELLI *et al.*, 2007). O sucesso da infecção e a manutenção do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado dependem da ação de mediadores intracelulares que podem influenciar na morte ou auxiliar na replicação do parasito (LOPES *et al.*, 2000).

Moléculas produzidas pelos macrófagos participam ativamente da resposta imune e podem influenciar no processo inflamatório. Nos últimos anos, nosso grupo descreveu a ocorrência de apoptose de linfócitos no curso da infecção experimental do *T. cruzi* (LOPES *et al.*, 1995; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Recentemente, Weis e colaboradores (2009) demonstraram que macrófagos cultivados na presença de sobrenadantes de células apoptóticas expressavam a enzima HO-1. O mesmo grupo também sugeriu que esta expressão poderia estar envolvida com a ativação alternativa de macrófagos. Essa situação poderia favorecer um ambiente propício para a sobrevivência de parasitos intracelulares.

A indução farmacológica da HO-1, assim como dos produtos finais do catabolismo do heme estão sendo estudados visando sua possível utilização com fins terapêuticos, em diferentes modelos experimentais (revisto por GOZZELINO *et al.*, 2010). Na realização deste trabalho foram utilizados dois dos produtos da degradação do heme pela HO-1, biliverdina e bilirrubina, assim como duas metaloprotoporfirinas IX, uma indutora de HO-1, a CoPPIX e outra inibidora

da HO-1, o SnPPIX. As metaloprotoporfirinas IX têm como base a protoporfirina IX como encontrada no grupo heme, porém se diferem desta, por apresentar outro metal no lugar do ferro.

Como ainda não existe nenhum relato do envolvimento da HO-1 na infecção pelo *T. cruzi*, julgamos importante analisar o efeito modulador dessa enzima no crescimento desse parasita *in vitro*, bem como seu efeito sobre os fatores pró e anti-inflamatórios envolvidos na infecção por este parasita.

2. OBJETIVO GERAL

Verificar se a indução da HO-1, pela fagocitose de células apoptóticas por macrófagos peritoneais infectados pelo *T. cruzi* modula a infecção e os mediadores pró e anti-inflamatórios envolvidos nessa infecção.

2.1 - Objetivos Específicos

- ❖ Verificar se ocorre a expressão da enzima HO-1 em macrófagos peritoneais infectados ou não pelo *T. cruzi*, co-cultivados na presença ou ausência de células apoptóticas *in vitro*;
- ❖ Avaliar se a enzima HO-1 interfere na multiplicação do *T. cruzi in vitro*;
- ❖ Avaliar se a HO-1 exerce algum efeito na secreção de mediadores pró ou anti-inflamatórios no modelo de infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*;
- ❖ Verificar se a biliverdina e a bilirrubina, produtos finais da degradação do heme são capazes de modular a infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*;
- ❖ Avaliar o envolvimento do PPAR- γ na indução da HO-1.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1- Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c, com 6-8 semanas de idade foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), Fiocruz/RJ, e mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho, ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas para utilização de animais de laboratório, estabelecidas pela Comissão de Avaliação de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

3.2- Parasitos

O clone Dm28c do *Trypanosoma cruzi* (Contreras *et al.*, 1988) foi utilizado em todas as experiências. As formas epimastigotas foram cultivadas, através de passagens sucessivas, em meio BHI (Difco/Becton & Dickinson Laboratories, Detroit, USA) suplementado com hemina (25 mg/L, Sigma), ácido fólico (20 mg/L, Sigma) e 10% de soro fetal bovino inativado a 56 °C (SFB, Gibco-Invitrogen), e mantidas em estufa BOD a 27 °C. As formas metacíclicas do clone Dm28c do *T. cruzi* foram diferenciadas *in vitro* em meio TAU-P “Triatomine Artificial Urine” (190mM NaCl; 8 mM de tampão fosfato de sódio, pH 6,0; 17 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 0,035% de NaHCO₃, com adição de 10 mM de L-prolina; todos da Sigma Chemical Co.), segundo o protocolo descrito por Contretas *et al.*, (1985).

3.3 - Obtenção de células apoptóticas

Como fonte de células apoptóticas foi utilizada a linhagem de linfócitos T humanas Jurkat, mantidas em cultura em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 5x10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol, 10 µg/ml de gentamicina, 10 mM de hepes, 1mM de piruvato de sódio e 10%

de soro fetal bovino (todos da Gibco-Invitrogen). As células T Jurkat foram lavadas 2x em HBSS sem soro, ressuspensas em DMEM suplementado com 1% de nutridoma (Roche Healthcare, EUA) distribuídas em garrafas para cultura de células de 25 cm², e em seguida foram expostas a irradiação ultravioleta a 254 nm por 10 minutos. Após este período, as células foram cultivadas por um período adicional de 2 horas a 37 C em atmosfera úmida contendo 7% de CO₂. A avaliação do percentual de células apoptóticas pela marcação com anexina V-FITC (BD-Pharmingem, EUA), e pela contagem com corante vital azul de Trypan mostrou que 80% das células estavam apoptóticas (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006). As células apoptóticas eram adicionadas a cultura de macrófagos 24 horas após serem adicionadas as formas tripomastigotas do *T. cruzi* a cultura, juntamente com os demais estímulos (citados abaixo) numa relação de 3 células apoptóticas para 1 macrófago (15x10⁵/poço).

3.4 - Obtenção de macrófagos e avaliação da carga parasitária *in vitro*

Macrófagos peritoneais murinos residentes foram obtidos de camundongos BALB/c através do lavado da cavidade peritoneal com 5 mL de DMEM (Gibco-Invitrogen) suplementado e sem soro. As células foram contadas, ajustadas em meio DMEM contendo 10% de SFB e 5x10⁵ macrófagos foram distribuídos em triplicatas em placa de 24 poços (TPP-Switzerland). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 7% CO₂ por 24 horas para aderência dos macrófagos. Após esse período, os macrófagos foram infectados por 24 horas com formas tripomastigotas metacíclicas diferenciadas *in vitro* do *T. cruzi* numa proporção parasito:célula de 3:1 (15x10⁵ parasitos/poço). No dia seguinte os poços foram lavados com HBSS sem soro para remoção dos parasitos não interiorizados e, mantidos em meio DMEM suplementado com 1% de nutridoma. Os diferentes estímulos (citados abaixo) foram adicionados a cultura de células.

3.5 – Avaliação dos Parasitos

A multiplicação dos parasitos (tripomastigotas liberados na cultura) foi avaliada após sete e onze dias em cultura pela contagem em câmara de Neubauer. Para avaliação das formas amastigotas e para coleta dos sobrenadantes das culturas, os macrófagos foram cultivados sobre lamínulas de vidro estéreis (Knittel, Alemanha) e submetidos ao mesmo esquema experimental descrito anteriormente. As lamínulas foram lavadas com PBS 1X, fixadas em metanol, coradas com panótico rápido (Laborclin, Paraná), montadas sobre lâminas em Enthelan[®] (Merk, EUA) e o número de amastigotas por 100 macrófagos foi avaliado em microscopia ótica de imersão (Zeiss, Alemanha).

3.6 – Reagentes

Todos os estímulos citados abaixo foram adicionados 24 horas depois da infecção dos macrófagos com a forma tripomastigota do *T. cruzi*, seguindo com a adição das células apoptóticas quando necessário.

O indutor da enzima HO-1 (CoPPIX), o inibidor da enzima HO-1 (SnPPIX), a biliverdina e a bilirrubina, obtidos da empresa Frontier Scientific, foram dissolvidos em NaOH 0,1 N (estéril), e diluições seriadas foram realizadas em DMEM suplementado e sem soro, até atingirem a concentração desejada (50 μ M, com exceção da bilirrubina, cuja concentração era de 25 μ M) e filtradas. A solução estoque de cada um dos reagentes era mantida protegida da luz, na temperatura de -20°C.

O antagonista sintético do PPAR- γ , GW9667 (Cayman Chemical) foi dissolvido em DMSO e diluído em DMEM suplementado e sem soro, tendo como concentração final 1 μ M. A solução estoque de cada um dos reagentes eram mantidas protegidas da luz, na temperatura de -

20°C. O GW9662 foi utilizado em apenas alguns experimentos, o mesmo foi adicionado na cultura no mesmo dia dos demais estímulos, porém, 6 horas antes.

O LPS derivado de *Salmonella enterica* sorotipo *typhimurium* (Sigma) foi utilizado em alguns experimentos de dosagem de citocinas e óxido nítrico, na concentração de 10 µg/mL, sozinho ou com IFN-γ (0,5 ng/mL).

O anticorpo anti-TGF-β e seu isotipo controle (eBioscience), foram utilizados na concentração de 10µg/mL. A solução estoque era mantida à -20°C.

3.7 - Dosagens de citocinas por ELISA

As citocinas TNF-α, IL-10 e TGF-β foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células coletados 48 horas após a adição do último estímulo, pelo método imunoenzimático do tipo sanduiche (ELISA) utilizando-se o protocolo descrito pelo fabricante. Os sobrenadantes foram mantidos a -20 °C até o momento da utilização. Para dosagem do TGF-β, os sobrenadantes foram previamente acidificados com HCl para ativação dessa citocina nos sobrenadantes e posteriormente neutralizados com uma solução de NaOH 1,2N e Hepes 0.5 M. Resumidamente, placas de cultura 96 poços (TPP) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para as diferentes citocinas a serem dosadas (50 µl/poço) diluídos em tampão carbonato pH 9 e incubadas por 24 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas com solução tamponada com fosfatos pH 7,2 (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) (Sigma Chemical Co., EUA) em lavador automático de placas (Skan Washer 400, Molecular Devices, EUA). Depois dessa etapa, 100 µL de PBS suplementado com 10% de SFB foram distribuídos nos poços e a placa incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, o PBS + 10% de SFB foi descartado e as diferentes concentrações das várias citocinas recombinantes e as amostras a serem testadas (50

µl/poço), foram acrescentadas aos poços em duplicatas. As placas contendo as amostras e a curva-padrão foram incubadas ON a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T e foram adicionados os anticorpos secundários específicos para as citocinas marcados com biotina. As placas foram incubadas por 2 horas, a 37 °C e, a seguir foram lavadas com PBS-T. A reação foi revelada com fosfatase alcalina conjugada a estreptoavidina (Southern Biotechnology Associates INC. Birmingham, AL) usando paranitrofenol fosfato como substrato (Sigma Chemical Co.). A leitura foi realizada por absorvância em 405 nm através de um leitor de ELISA (VERSA_{Max} Microplate Reader, Molecular Devices, EUA).

3.8 - Dosagem de prostaglandina (PGE₂) por ELISA

Placas para ELISA foram sensibilizadas com 200 µl de anticorpo de cabra anti-Imunoglobulina G de camundongo (IgG) diluído em tampão fosfato de potássio a 0,05 M e incubadas por 24 horas a temperatura ambiente. Após esta etapa as ligações inespecíficas foram bloqueadas com a adição de 200 µl de tampão fosfato de potássio 0,05 M contendo 3% de BSA, e a placa foi mantida sob agitação por 4 horas. Após esse período a placa foi lavada com tampão fosfato de potássio contendo 0,05% de Tween 20. Em seguida, foram adicionados 50 µl das amostras ou de prostaglandina E₂ da curva padrão. O anticorpo anti prostaglandina E₂ conjugada a colinesterase (50 µl) foi adicionado e incubado durante 16 horas. Após esta etapa, a placa foi lavada (5x) com Tween 20 a 0,05% em PBS. Em seguida foram adicionados 200 µl do reagente de Elman para revelar a reação. A placa foi mantida sob agitação durante 2 horas e a reação colorimétrica foi analisada em espectrofotômetro de placa a 405 nm. Os dados foram analisados com o programa Soft Max Pro, e a dosagem baseada na curva padrão (Cayman Chemical, Amn Anbor, MZ).

3.9 - Ensaio de produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada indiretamente pela medida da produção de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante das culturas. A concentração de nitrito foi determinada através de reação colorimétrica de Griess. Resumidamente, 50 μl do reagente de Griess foram adicionados a 50 μl do sobrenadante e após 10 minutos a temperatura ambiente, a absorvância foi determinada (filtro de 540nm) em espectrofotômetro (GREEN *et al.*, 1982).

3.10- Ensaio de Western Blot

As culturas de macrófagos infectados pelo *T. cruzi* e co-cultivados com a linhagem de células T Jurkat apoptóticas por 24 horas, foram lavadas com PBS, e em seguida, foi adicionado 1 mL do tampão de lise (Gibco BRL) e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Para assegurar que todas as células distribuídas em triplicatas nas placas de 6 poços (TPP, Switzerland) e submetidas aos diferentes estímulos estavam sendo utilizadas, os poços foram raspados com auxílio de “cell scraper”. O homogenato de cada uma das triplicatas foi transferido para tubos 15 mL e submetidas à centrifugação a 2000 RPM. Os pellets foram ressuspensos em solução tampão (20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM ditioneitol, 0.5% triton X-100 suplementado com coquetel de inibidor de protease – Calbiochem, EUA) e fervidas por 5 minutos à 100 °C e posteriormente separadas por eletroforese em SDS-PAGE 10% a 100 V. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em um sistema de blotting (BIO-RAD, Hercules, CA) por 30 minutos/30 v. A membrana foi incubada por 1 hora com 5% de BSA em tampão TBS, para bloquear as ligações não específicas. A membrana foi então incubada a temperatura ambiente e incubada com anticorpo primário anti-HO-1 (Santa Cruz - Biotechnology, EUA) por 24 horas a 4^o C. Posteriormente, a membrana foi lavada 5 vezes com

tampão de lavagem (TBS 0,1% Tween 20) e incubada com o anticorpo secundário por 1 hora a temperatura ambiente (anti-IgG de coelho marcado com peroxidase– Cayman Chemical Company). A reação foi detectada utilizando-se o kit de quimioluminescência “ECL Plus Western Blotting detection system” de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences).

3.11 - Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 4 (Sigma) para Windows utilizando o método “One-way ANOVA”.

4. RESULTADOS

4.1 - Indução da expressão da enzima HO-1 em macrófagos co-cultivados com células apoptóticas

Existem poucas informações a respeito da participação da HO-1 na infecção pelo *T. cruzi*, investigou-se os possíveis efeitos moduladores dessa enzima na infecção experimental por este parasita. Nesse sentido, o primeiro passo foi avaliar a expressão da enzima HO-1 em macrófagos infectados ou não, na presença de células apoptóticas, através da técnica de *Western Blot*. Os resultados mostraram, que a infecção pelo *T. cruzi* por si só, induziu a expressão da enzima HO-1 em quantidades basais bem como observado pelos macrófagos não infectados. Por outro lado, nas culturas de macrófagos, infectados ou não pelo *T. cruzi*, e co-cultivados com células apoptóticas, verificou-se um aumento significativo da expressão da HO-1 (Fig. 5).

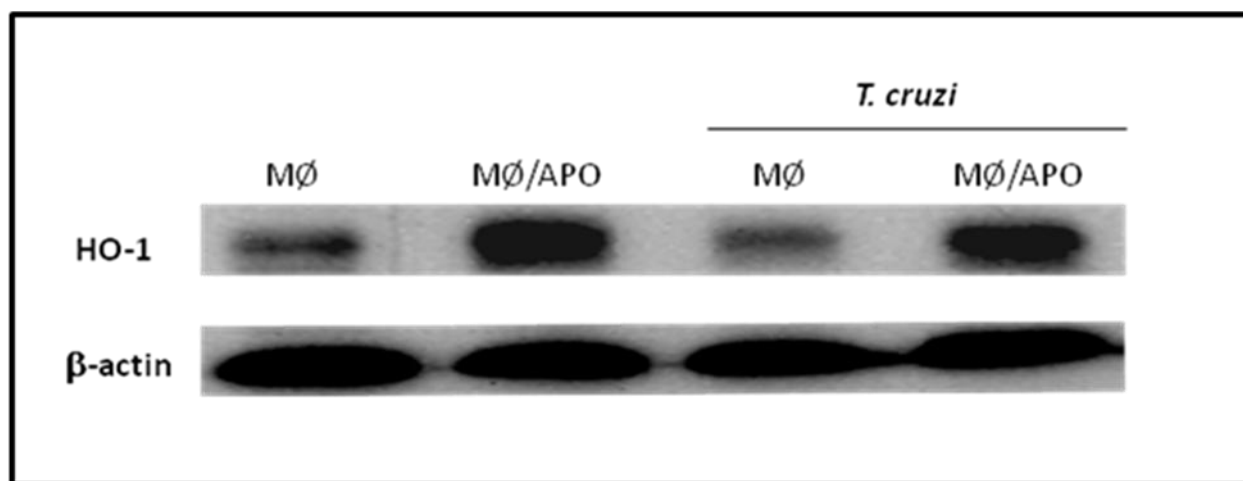


Figura 5: A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos aumenta a expressão da enzima HO-1. Macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c foram infectados ou não pelo *T. cruzi* e co-cultivados na presença ou ausência de células apoptóticas em placa de 6 poços por 24 horas. Após este período, as células foram lisadas e o conteúdo proteico avaliado quanto à expressão de HO-1 por Western Blot. A figura mostra o resultado de um experiência representativa.

4.2 - Ativação da enzima HO-1 favorece a replicação do *T. cruzi* *in vitro*

O próximo passo foi avaliar o efeito dessa enzima sobre a replicação do *T. cruzi in vitro*. Com esse objetivo, macrófagos infectados pelo parasito foram co-cultivados com células apoptóticas, com células apoptóticas na presença do inibidor da HO-1 (estanho protoporfirina - SnPPIX), com o inibidor somente, e com o indutor da HO-1 (cobalto protoporfirina – Co PPIX).

Foi observado que o tratamento com células apoptóticas exacerbou a replicação do parasita como avaliado pela contagem das formas tripomastigotas viáveis nos sobrenadantes das culturas, após 7 e 11 dias de incubação. A adição do indutor da HO-1 aos macrófagos infectados, resultou num efeito similar. Por outro lado, o tratamento com o inibidor da HO-1 na presença ou ausência de células apoptóticas foi capaz de controlar o crescimento dos parasitas *in vitro* (Fig. 6A e B). Mostrando que o inibidor da HO-1 na presença das células apoptóticas reverteu o efeito observado quando macrófagos infectados pelo *T. cruzi* eram co-cultivados na presença de células apoptóticas.

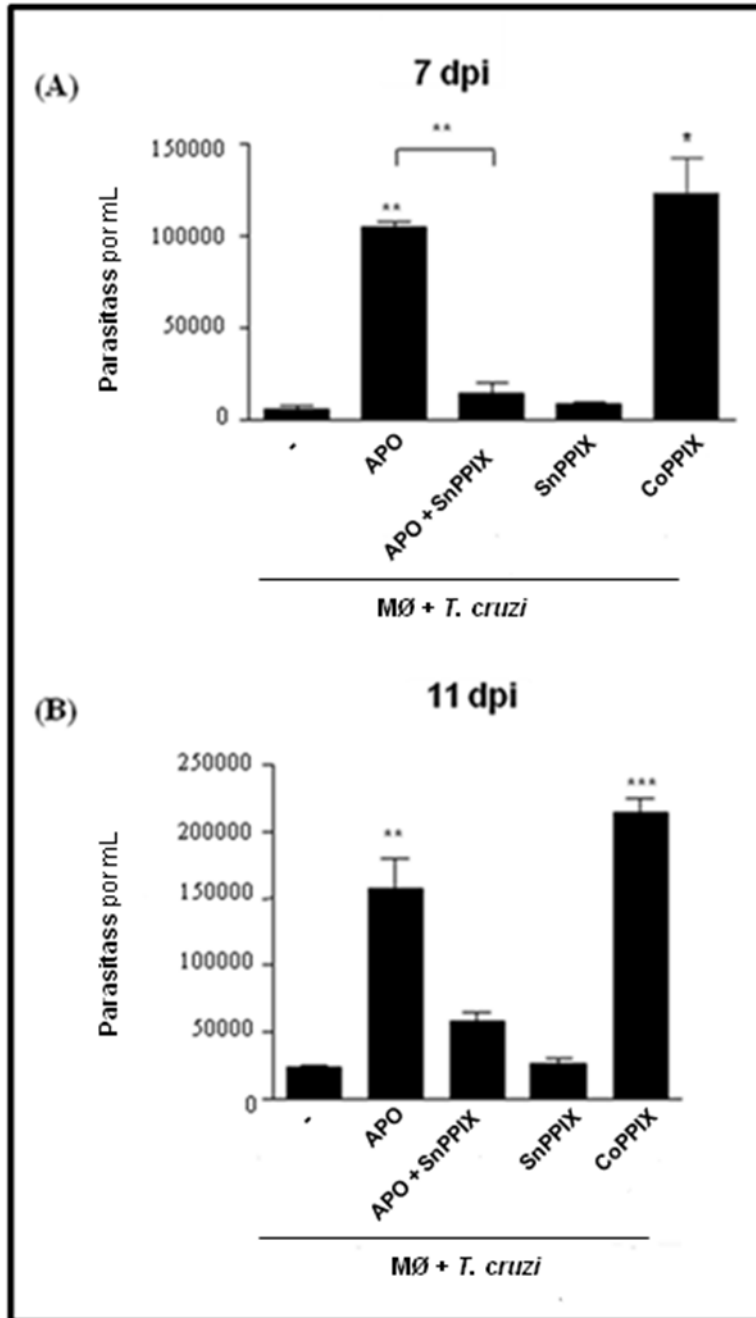


Fig. 6 – A indução da enzima HO-1 e as células apoptóticas exacerbam a replicação do *T. cruzi* *in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) foram infectados com *T. cruzi* (15×10^5) e 24hs depois foram tratados com o indutor da HO-1 (CoPPIX, $50 \mu\text{M}$), com o inibidor (SnPPIX, $50 \mu\text{M}$) na presença de células apoptóticas (APO, 15×10^5), ou somente com células apoptóticas. A carga parasitária foi determinada em câmara de Neubauer pela contagem das formas tripomastigotas viáveis liberadas no sobrenadante. Resultados representativos (médias \pm SD de triplicatas) de três experiências independentes. Os asteriscos indicam (***) $p \leq 0,001$, (**) $p \leq 0,01$ e (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle.

Com o objetivo de avaliar se o número de parasitas livres no sobrenadante era um reflexo do número de formas amastigotas, macrófagos foram cultivados e infectados sobre lamínulas e submetidos aos mesmos tratamentos. Os resultados apresentados na figura 6 confirmam que a fagocitose de células apoptóticas ou a presença do indutor da HO-1 favoreceu a replicação das formas amastigotas do *T. cruzi in vitro*. Entretanto, a adição do inibidor da HO-1 sozinho ou em associação com as células apoptóticas foi capaz de controlar o crescimento das formas intracelulares (Fig. 7 A). Em contraste, não foi observado diferença significativa entre o número de macrófagos infectados submetidos aos diferentes tratamentos, mostrando que a infecção não influenciou no número de amastigotas (Fig. 7 B).

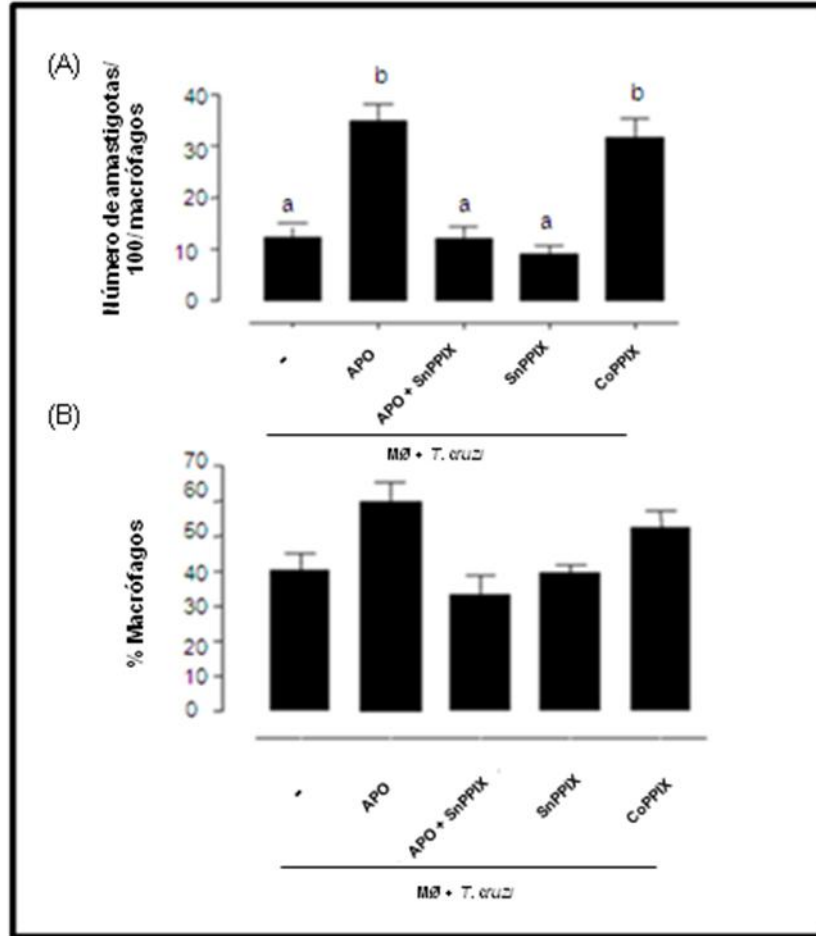


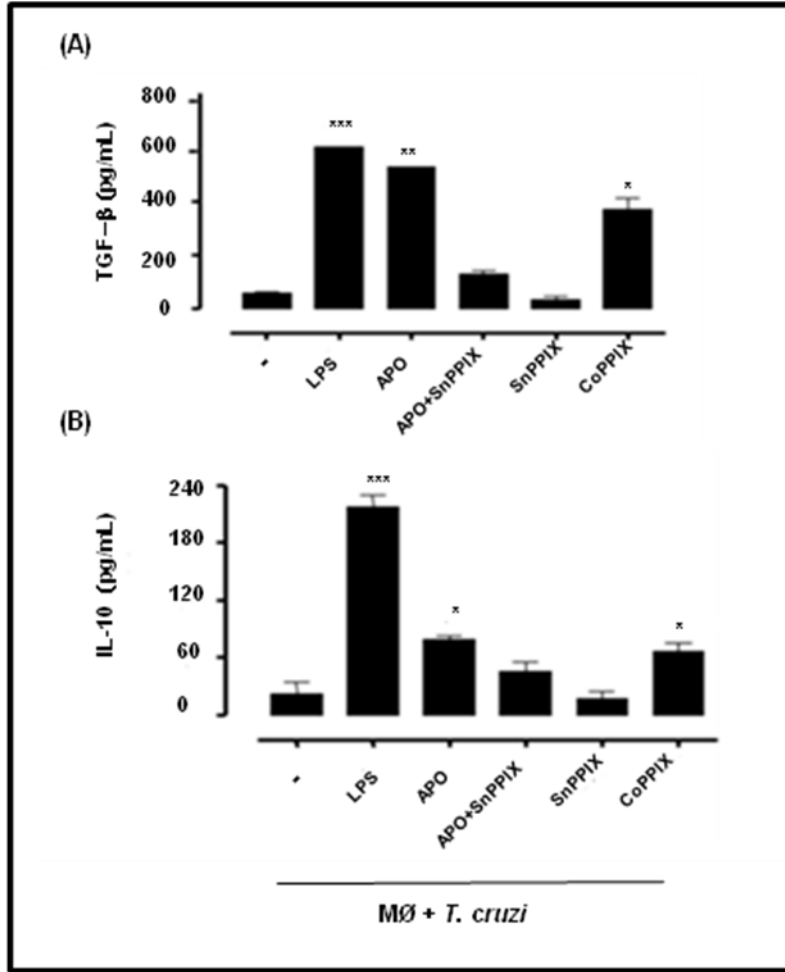
Figura 7: HO-1 exacerbou a replicação da carga parasitária intracelular. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) cultivados sobre lamínulas foram infectados com *T. cruzi* (15×10^5) e 24hs depois foram tratados com o indutor da HO-1 (CoPPIX, $50 \mu\text{M}$), com o inibidor (SnPPIX – $50 \mu\text{M}$), com o inibidor (SnPPIX, $50 \mu\text{M}$) na presença de células apoptóticas (APO, 15×10^5), ou somente com células apoptóticas. Três dias após, as lamínulas foram fixadas, coradas e o número de amastigotas foi avaliado por microscopia óptica. Os resultados (médias \pm SD de triplicatas) apresentados são representativos de três experiências realizadas separadamente. (A) Número de amastigotas/100 macrófagos. (B) Percentual de macrófagos infectados. Os resultados da figura (A) apresentam significância estatística quando se compara os valores obtidos em a e b.

4.3 – A atividade da HO-1 modula a produção de fatores anti-inflamatórios.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a HO-1, assim como a fagocitose das células apoptóticas modulam a infecção pelo *T. cruzi in vitro*. Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura que mostraram que a interação das células apoptóticas com macrófagos infectados favorecia a replicação do *T. cruzi* que era mediada por TGF- β e PGE $_2$

(FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000), Nesse sentido decidimos avaliar o possível envolvimento da atividade da enzima HO-1 na modulação da produção de fatores anti-inflamatórios.

A avaliação da produção de fatores anti-inflamatórios como citocinas IL-10 e TGF- β e o mediador lipídico PGE₂ pelos macrófagos peritoneais infectados com *T. cruzi* e cultivados com CoPPIX, SnPPX, células apoptóticas/SnPPIX, ou células apoptóticas somente, mostrou que houve um aumento da produção de todos estes fatores nos sobrenadantes das culturas estimuladas com células apoptóticas e com o indutor da HO-1 (Fig. 8 A, B e C). Como controle positivo da produção desses fatores anti-inflamatórios os macrófagos foram estimulados com LPS pelo mesmo período de tempo. Nessas mesmas condições foi possível observar que na presença da célula apoptótica, o inibidor da HO-1 reverteu a produção de TGF- β , IL-10 e PGE₂ observada nas culturas de macrófagos co-cultivados com células apoptóticas somente (Fig. 8 A, B, e C). A presença do inibidor da HO-1 não acarretou em nenhuma alteração na produção desses fatores, apresentando níveis semelhantes aos sobrenadantes dos poços controle (macrófagos infectados sem qualquer estímulo).



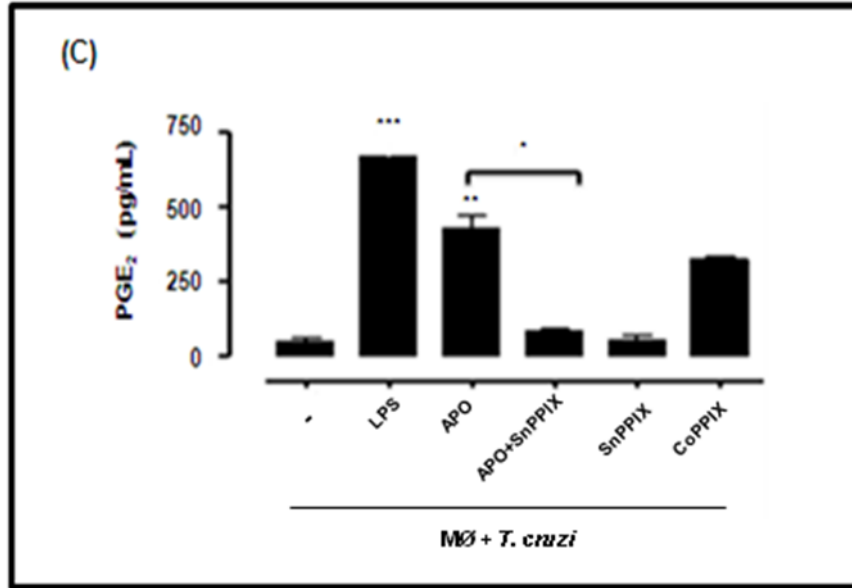


Figura 8: Produção de moléculas anti-inflamatórias induzida pela HO-1. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi* (15×10^5), foram cultivados por 48 horas com LPS (controle positivo, 1ng/mL), com células APO, com CoPPIX (50 μ M), com SnPPIX (50 μ M), ou com APO (15×10^5)+SnPPIX (50 μ M). A produção de TGF- β (A), IL-10 (B) e PGE₂ (C) foi avaliada nos sobrenadantes por ELISA. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão da média (SD) dos resultados obtidos de triplicatas de um experiência representativa de 3 realizadas separadamente. Os asteriscos indicam (***) $p \leq 0,001$, (**) $p \leq 0,01$ em relação ao controle e (*) $p \leq 0,05$ comparado aos valores observados nas culturas na presença de células apoptóticas somente e células apoptóticas com o inibidor da HO-1.

4.4 – Avaliação da produção de TNF- α e NO induzida pela enzima HO-1.

Com o objetivo de estudar a ação da enzima HO-1 na produção de moléculas pró-inflamatórias realizamos experimentos para obtenção de sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados pelo *T. cruzi* estimulados (Figs. 9 B e D) ou não (Figs. 9 A e C) com LPS e IFN- γ e tratados com os diferentes estímulos como descritos nas figuras. Os resultados mostraram que quando os macrófagos não foram cultivados na presença de LPS e IFN- γ não houve aumento significativo da produção de TNF- α e NO em relação as culturas controle estimuladas somente com LPS (Figs 9 A e C). Contudo, foi observado que a diminuição de TNF- α e NO quando macrófagos infectados pelo *T. cruzi* eram co-cultivados com células apoptóticas

foi revertida quando essas células eram colocadas na presença do inibidor da HO-1. A indução da HO-1 pela fagocitose de células apoptóticas bem como pelo CoPPIX foi incapaz de favorecer a produção de TNF- α e NO (Fig. 9 A e 9 B), mesmo quando os macrófagos eram estimulados com LPS/IFN- γ (Fig. 9 A e 9 B). Sugerindo que a indução da HO-1 pela fagocitose das células apoptóticas regula negativamente a produção de TNF- α e NO pelos macrófagos infectados.

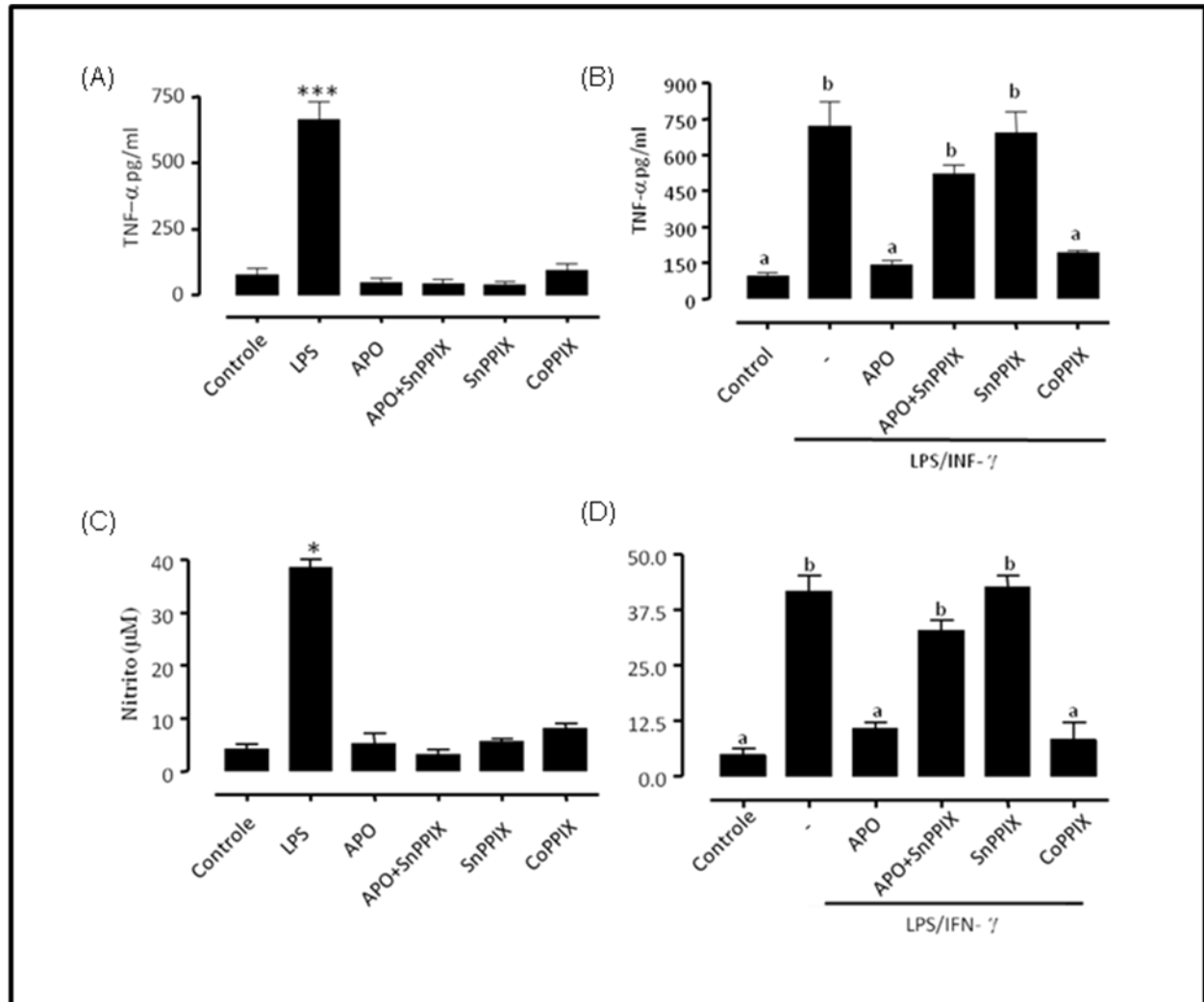


Figura 9: Avaliação da produção de TNF- α e NO induzida pela enzima HO-1. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi* (15×10^5) e cultivados em meio somente, estimulados (Figs. 8 B e D) ou não (Figs. 8 A e C) com LPS e IFN- γ (10 μ g/mL e 0,5 ng/mL, respectivamente) na presença dos diferentes estímulos como mostrado nas figuras. Após 48 horas de cultura a produção de TNF- α e NO nos sobrenadantes foi avaliada. Os resultados apresentados (média \pm SD de triplicatas) são de um experimento representativo. Os asteriscos indicam (***) $p \leq 0,001$, (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle de macrófagos infectados cultivados com meio somente (Figs. A e C). Os resultados da figuras 8 B e D apresentam significância estatística quando comparados aos valores obtidos em a e b. Resultados semelhantes foram obtidos em outros dois experimentos independentes.

4.5 – A produção do TGF- β pelo indutor da HO-1 favorece a replicação do *T. cruzi*.

Os estudos que avaliaram a atividade biológica do TGF- β mostraram que essa citocina age como desativador de muitas funções desempenhadas por macrófagos, como por exemplo, inibindo a síntese de iNOS, e por sua vez bloqueia a produção de NO por macrófagos ativado (LIEW *et al.*, 1990). A presença do TGF- β afeta a capacidade tripanocida de macrófagos ativado, o que representa um mecanismo de escape do parasito. Com base nessas informações, questionamos se a produção de TGF- β pelos macrófagos infectado e tratado com células apoptóticas (Fig. 10 A) ou cultivado na presença do indutor da HO-1 (Fig. 10 B) estava exacerbando a replicação do parasito. Para isso, foi adicionado o anticorpo neutralizante às culturas de macrófagos infectado co-cultivado com células apoptóticas ou tratado com indutor da HO-1. Nossos resultados revelaram que na presença do anticorpo anti-TGF- β houve uma diminuição do número de formas tripomastigotas nessas culturas. Esses resultados confirmam o papel determinante do TGF- β como um importante mecanismo de escape do *T. cruzi*. Indicando que a enzima HO-1 parece agir de maneira dependente de TGF- β .

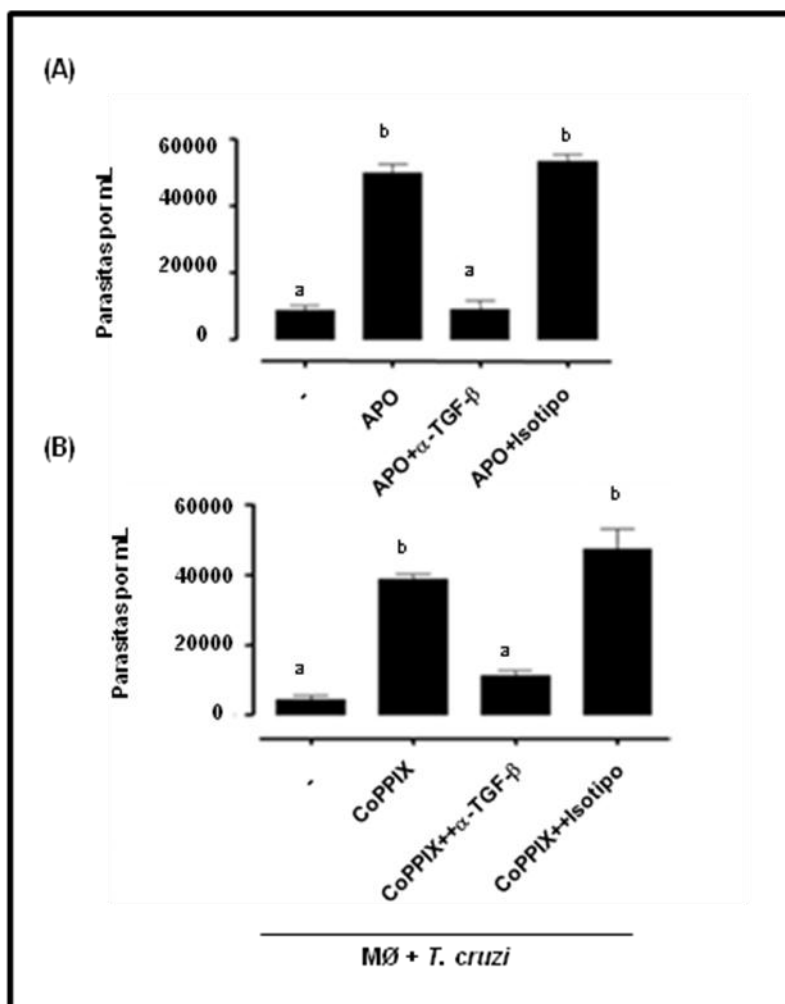


Figura 10: A produção de TGF- β induzida pela HO-1 favorece o crescimento do *T. cruzi*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) foram infectados com *T. cruzi* (15×10^5) e 24hs depois foram incubadas com células apoptóticas (APO, 15×10^5), células apoptóticas na presença de anticorpo anti-TGF- β ($10 \mu\text{g/mL}$), ou células apoptóticas na presença do isotipo controle do anti-TGF- β (A), e tratados com indutor da HO-1 (CoPPIX, $50 \mu\text{M}$), na presença anticorpo anti-TGF- β , ou CoPPIX na presença do isotipo controle (B). A determinação da carga parasitária foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer em microscópio óptico. Os resultados apresentados (média \pm SD de triplicatas) são de um experimento representativo. Os resultados apresentaram significância estatística quando comparado aos valores obtidos em a e b. Resultados semelhantes foram obtidos em outros dois experimentos independentes.

4.6 – Efeito dos subprodutos do heme, biliverdina e bilirrubina, na replicação do *T. cruzi* e na produção de moléculas pró e anti-inflamatórias.

Com base nos resultados anteriores, no qual demonstramos a importância da indução da enzima HO-1 na infecção pelo *T. cruzi* e na produção de moléculas pró e anti-inflamatórias questionamos se a biliverdina (BV) e bilirrubina (BR) desempenhariam algum papel no nosso sistema experimental. Tanto a BV quanto a BR, produtos do catabolismo do heme pela HO-1, possuem atividades anti-oxidantes e anti-inflamatória (HAYASHI *et al.*, 1999).

Com o intuito de verificar o efeito da BV e BR na replicação do *T. cruzi* e na produção de moléculas pró e anti-inflamatórias utilizamos o mesmo sistema dos experimentos anteriores, onde além dos estímulos testados anteriormente, foram acrescentadas essas duas moléculas. Os resultados da Fig. 11 revelaram que a adição tanto de BV quanto de BR aumentou o número de tripomastigotas viáveis nessas culturas. É importante ressaltar que resultados similares foram observados quanto ao número de amastigotas no interior de macrófagos infectados (Fig. 12).

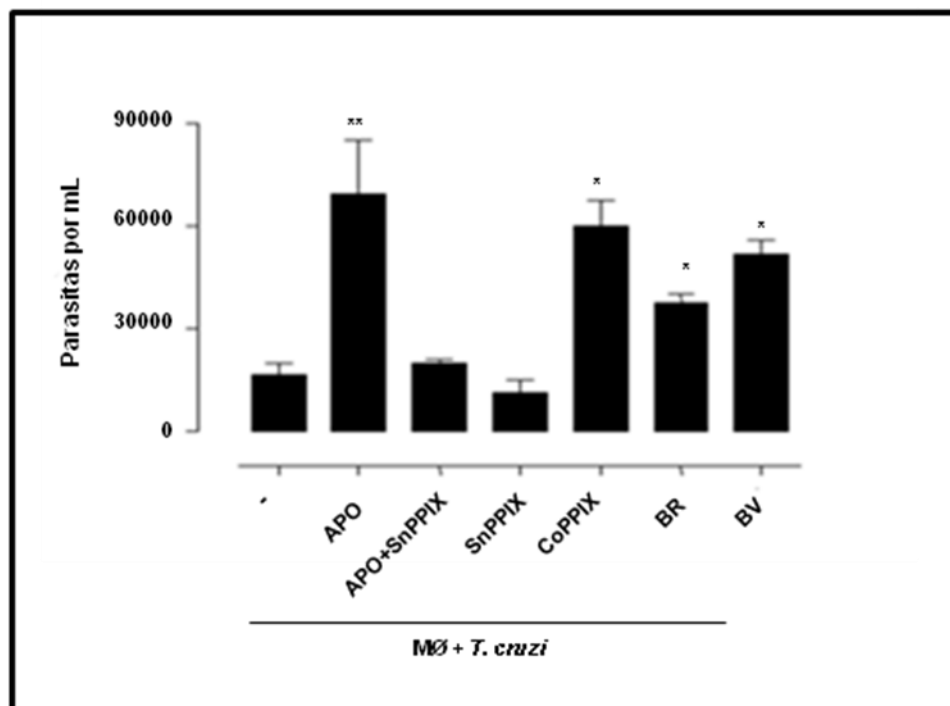


Figura 11: A adição exógena de BV e BR também favorece o crescimento do *T. cruzi in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi* (15×10^5) e cultivados em triplicatas em placas de 24 poços na presença dos estímulos já utilizados anteriormente e na presença de BV ($50 \mu\text{M}$) e BR ($25 \mu\text{M}$) adicionados separadamente. Sete dias após a adição dos estímulos o número de tripomastigotas foi avaliado no sobrenadante dessas culturas em câmara de Neubauer por microscopia óptica. Os valores apresentados são de uma experiência representativa de três realizadas separadamente. Os asteriscos indicam (**) $p \leq 0,01$ e (*) $p \leq 0,05$ comparados aos poços controle de macrófagos infectados cultivados somente com meio de cultura.

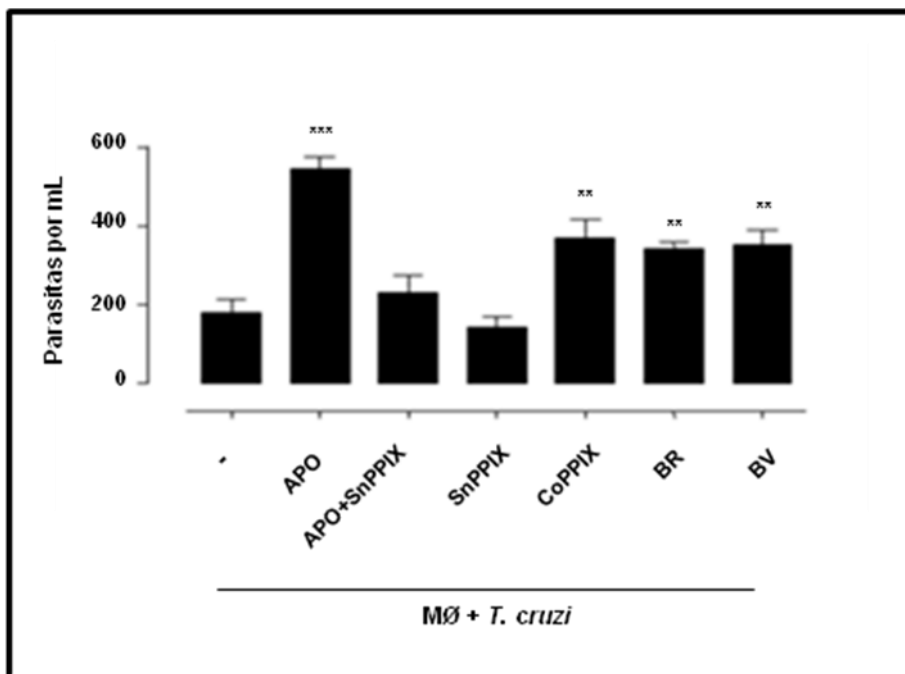


Figura 12: Exarcebação da carga parasitária intracelular induzida por BV e BR. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) foram cultivados sobre lamínulas em triplicatas em placas de 24 poços e infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi* (15×10^5), na presença dos estímulos já utilizados anteriormente e na presença de BV ($50 \mu\text{M}$) e BR ($25 \mu\text{M}$) adicionados separadamente. Três dias após o início das culturas, as lamínulas foram lavadas, fixadas, coradas, montadas e o número de amastigotas em 100 macrófagos avaliado por microscopia óptica. Os valores apresentados são de uma experiência representativa de três realizadas separadamente. Os asteriscos indicam (***) $p \leq 0,001$ e (**) $p \leq 0,01$ comparados aos poços controle de macrófagos infectados cultivados somente com meio de cultura.

Como já citado, o TGF- β é uma das citocinas envolvidas na desativação de macrófagos e consequente eliminação da atividade microbicida. Dessa forma, avaliamos a produção dessa citocina quando macrófagos peritoneais infectados foram cultivados na presença de LPS, células apoptóticas, BV ou BR. Os resultados mostraram que houve aumento da produção de TGF- β em todos os tratamentos quando comparado com os poços controle (macrófagos infectados com *T. cruzi*) (Fig. 13). Efeito similar da produção de TGF- β foi observado quando células apoptóticas eram colocadas em co-cultura com macrófagos infectados pelo *T. cruzi* (Fig. 8 A).

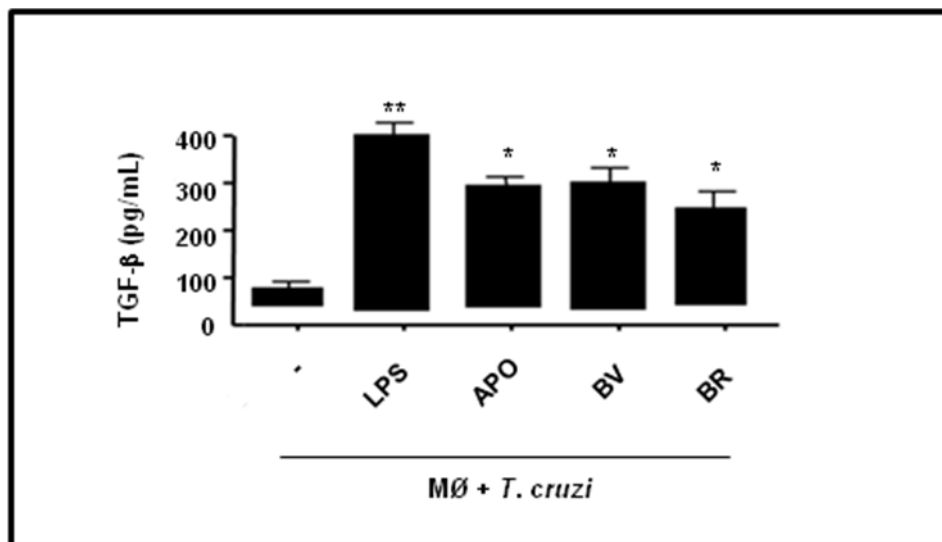


Figura 13: A produção de TGF-β é induzida por BV e BR. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi* (15×10^5) foram cultivados por 48 horas com LPS (controle positivo, $10 \mu\text{g/mL}$), com células apoptóticas (15×10^5), BV ($50 \mu\text{M}$) e BR ($25 \mu\text{M}$). A produção de TGF-β foi avaliada nos sobrenadantes das culturas por ELISA. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão da média (SD) dos resultados obtidos de triplicatas de um experimento representativa de 3 realizadas separadamente. Os asteriscos indicam (**) $p \leq 0,01$ em relação ao controle e (*) $p \leq 0,05$ comparado aos valores observados nas culturas infectadas com *T. cruzi* na presença de meio apenas.

Adicionalmente, foi avaliado também a produção de TNF- α e NO. Como esperado, BV e BR por si só não foram suficientes para induzir a produção destes fatores inflamatórios por macrófagos infectados (Fig. 14 A e B). Resultados semelhantes foram observados nos macrófagos co-cultivados com células apoptóticas. Quando os macrófagos infectados pelo *T. cruzi* foram cultivados com LPS+IFN- γ , na presença de BV e BR, não houve alteração nos níveis de TNF- α (Figs. 15 A e B) e NO (Figs. 15 C e D). Para investigar se o TGF-β produzido estaria bloqueando o efeito da BV e da BR sobre a produção de TNF- α e NO, foram adicionados as culturas o anticorpo neutralizante anti-TGF-β e seu respectivo isotipo controle. De fato neutralização do TGF-β anulou o efeito exercido pela BV e BR na produção desta citocina, o que

favoreceu então, a produção de TNF- α (Figs. 15 A e B) e NO (Figs. 15 C e D) nos macrófagos cultivados na presença de LPS e IFN- α .

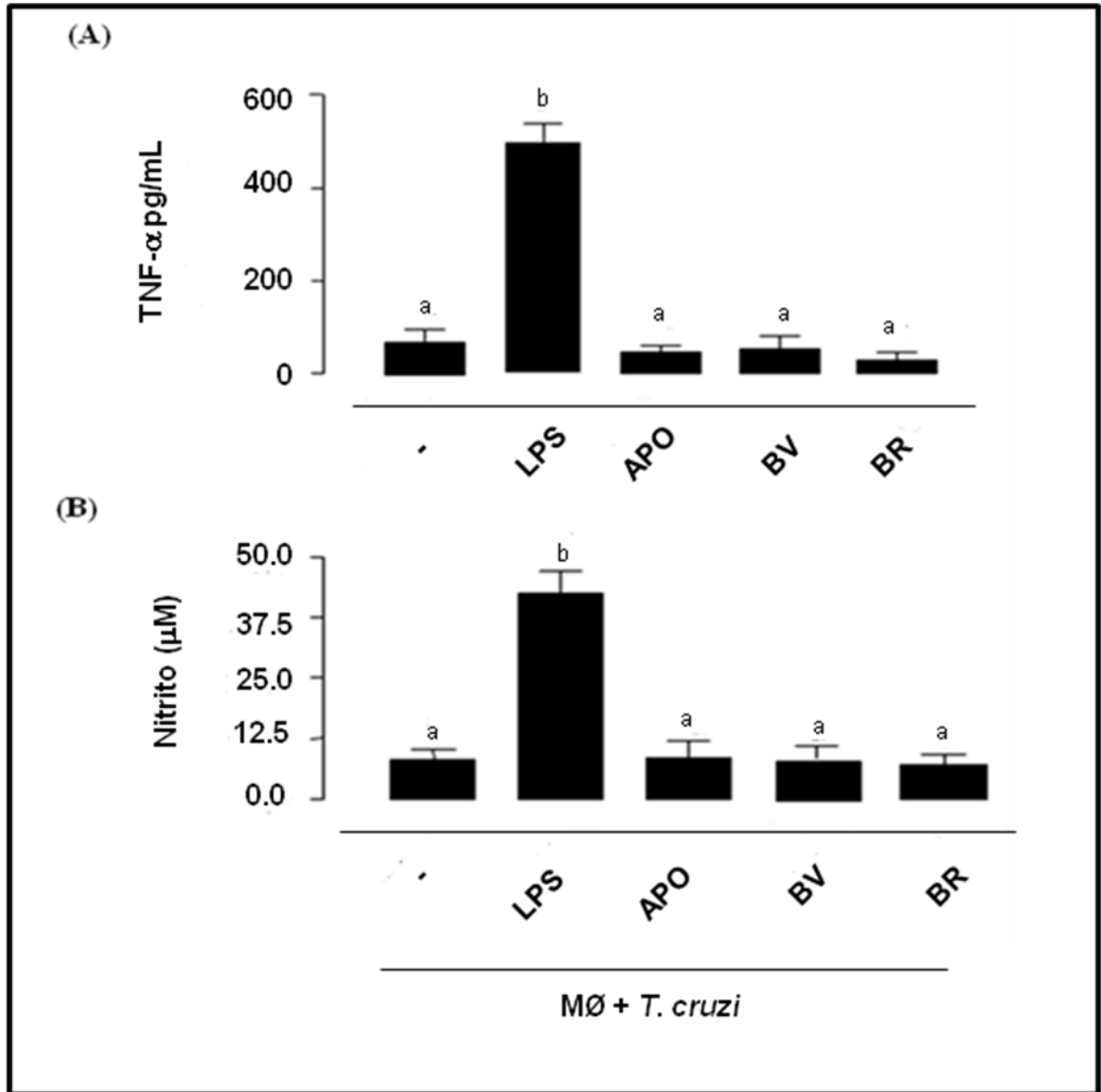


Figura 14: Ausência de produção de TNF- α e NO na presença de BV e BR. (A) Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi* (15×10^5) foram cultivados com LPS (controle positivo, $10 \mu\text{g/mL}$), com células apoptóticas (APO, 15×10^5), BV ($50 \mu\text{M}$), ou BR ($25 \mu\text{M}$), durante 48hs. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e a produção de TNF- α (Fig. 13 A) e NO (Fig. 13 B) avaliadas. Os resultados apresentados (média \pm SD de triplicatas) são de um experimento representativo. Os resultados apresentaram significância estatística quando comparado aos valores obtidos em a e b. Resultados semelhantes foram obtidos em outros dois experimentos independentes.

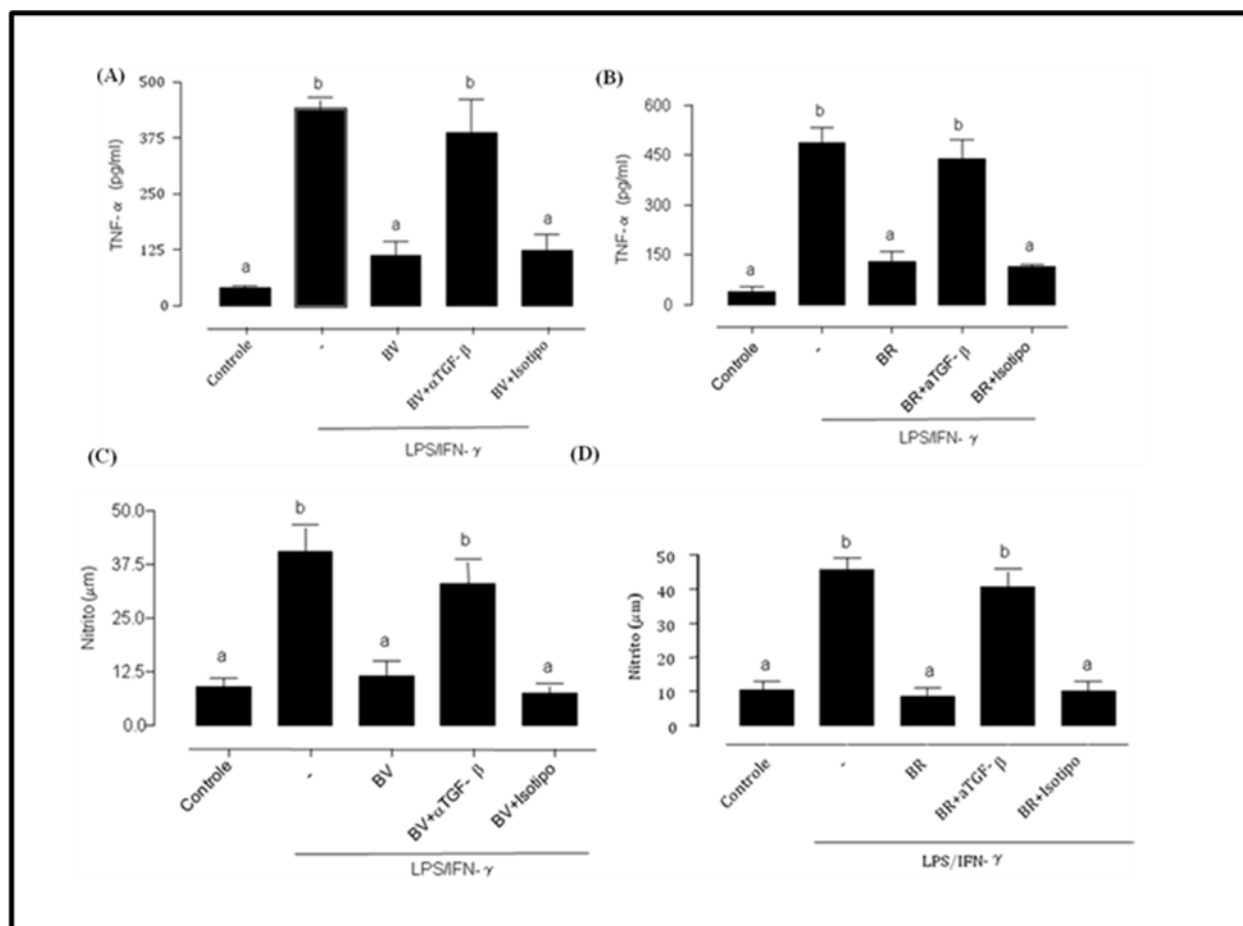


Figura 15: A neutralização do TGF-β permitiu a produção de TNF-α e NO por macrófagos infectados pelo *T. cruzi*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi* (15×10^5) foram cultivados em meio somente, ou estimulados com LPS e IFN- γ (10 μ g/mL e 0,5 ng/mL, respectivamente) na presença dos diferentes estímulos como mostrado nas figuras. Após 48 horas de cultura a produção de TNF- α (Figs. A e B) e NO (Figs. C e D) foi avaliada nos sobrenadanes. Os resultados apresentados (média \pm SD de triplicatas) são de um experimento representativo. Os resultados apresentam significância estatística quando comparado aos valores obtidos em a e b. Resultados semelhantes foram obtidos em outros dois experimentos independentes.

4.7 - Envolvimento do PPAR- γ na ativação da HO-1

A ativação do receptor nuclear PPAR- γ em macrófagos murinos, induzida pela fagocitose de células apoptóticas, já foi evidenciado por diferentes grupos (JOHANN *et al.*, 2006; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006). Mas recentemente, foi caracterizado que o receptor nuclear PPAR- γ modula a ativação da enzima HO-1 em células endoteliais humanas (Kronke *et al.*, 2007).

Para avaliar o papel do PPAR- γ no modelo experimental utilizado, macrófagos peritoneais infectados foram previamente tratados por 6 horas com GW9662, um antagonista do PPAR- γ . Em seguida foram adicionados às culturas os demais estímulos (células apoptóticas ou indutor da HO-1).

Após sete dias de incubação, foi avaliado o número de tripomastigotas viáveis nas culturas. Como mostram os resultados da figura 16 A, o GW9662 foi capaz de abolir o efeito imunossupressor, induzido pela fagocitose de células apoptóticas. Além disso, na presença do antagonista do PPAR- γ , foi verificado que esta molécula neutralizou o efeito do indutor da HO-1 (Fig. 16 B). Em ambos os casos, o bloqueio do receptor PPAR- γ resultou numa diminuição do número de formas tripomastigotas nas culturas.

Nossos resultados sugerem que o PPAR- γ pode participar dos efeitos imunomoduladores desencadeados pela ativação da HO-1, induzida pela fagocitose de células apoptóticas.

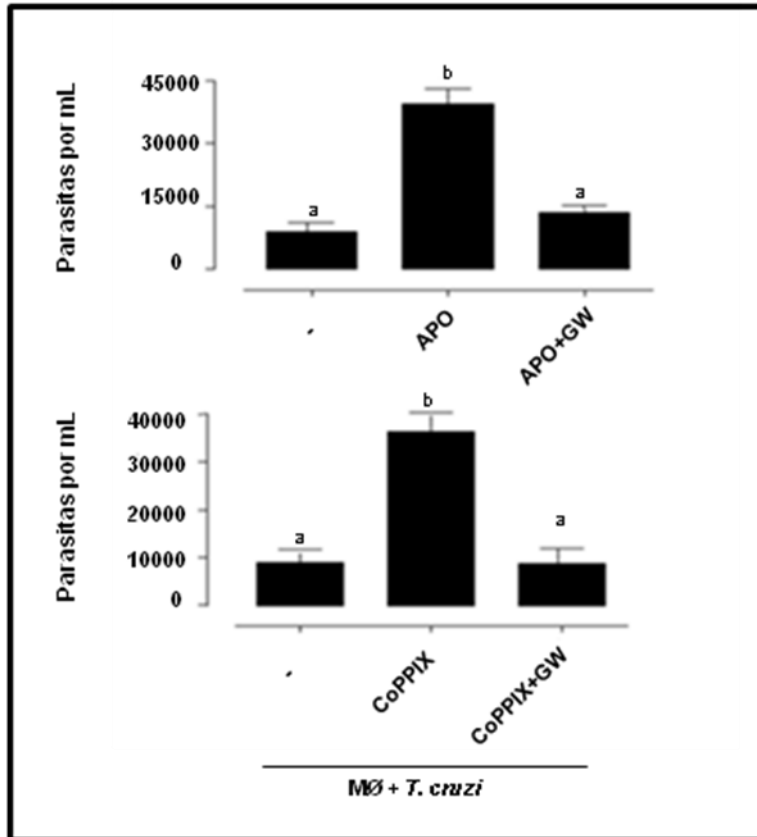


Figura 16: Efeito do antagonista do PPAR- γ , GW9662, sobre o crescimento do *T. cruzi* *in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi* (15×10^5) foram cultivados por 24 horas e posteriormente estimulados com GW9662 ($1 \mu\text{M}$). Seis horas depois foram adicionados os estímulos como células apoptóticas (APO, 15×10^5) (A), ou indutor da HO-1 (CoPPIX, $50 \mu\text{M}$) (B). A determinação da carga parasitária foi realizada em microscópio óptico com auxílio de câmera de Neubauer. Os resultados apresentados (média \pm SD de triplicatas) são de um experimento representativo. Os resultados apresentaram significância estatística quando comparado aos valores obtidos em a e b. Resultados semelhantes foram obtidos em outros dois experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

No processo de morte por apoptose, a célula apresenta características como agregação da cromatina, condensação citoplasmática nuclear, partição da membrana em corpos apoptóticos, o qual contém organelas morfológicamente intactas. Essas células apoptóticas, podem ser reconhecidas e removidas eficientemente por fagócitos profissionais (macrófagos e células dendríticas imaturas), semi-profissionais (fibroblastos) e não-profissionais (células endoteliais e fibras musculares) (HENSON & HUME *et al.*, 2006). O pronto reconhecimento dos corpos apoptóticos pelos fagócitos se dá graças a presença de moléculas expressas unicamente na superfície das células apoptóticas, tais como a fosfatidilserina, calreticulina, entre outras (revisto por PAIDASSI *et al.*, 2009).

A remoção de células apoptóticas por fagócitos exerce um importante papel no desenvolvimento e manutenção da homeostase tecidual, além de controlar a intensidade da resposta imunológica e participar ativamente da resolução da inflamação (FADOK *et al.*, 2001; HUYNH *et al.*, 2002; HOFFMANN *et al.*, 2005 FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006; ERWIN & HENSON, 2007).

Nosso grupo tem demonstrado nos últimos anos, que no curso da doença de Chagas experimental, ocorre uma intensa morte celular, caracterizada como apoptose linfocitária (LOPES *et al.*, 1995; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório demonstraram que a interação de células apoptóticas, mas não as células necróticas, com os macrófagos infectados pelo *T. cruzi*, exercem um importante papel na multiplicação das formas intracelulares, de uma maneira dependente da produção dos fatores anti-inflamatórios (TGF- β e PGE₂). Além da produção desses dois mediadores anti-

inflamatórios, também ocorre a indução da expressão da enzima arginase e atividade ODC, levando a produção e ao acúmulo de poliaminas, que funcionam como um importante fator para a multiplicação das formas amastigotas no interior dos macrófagos (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2000). Adicionalmente foi demonstrado que além da produção dos mediadores anti-inflamatórios, a fagocitose das células apoptóticas, inibe a produção de fatores inflamatórios e microbicidas, como o TNF- α e NO respectivamente (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006).

Dados da literatura mostram que a expressão da HO-1 pode ocorrer quando macrófagos humanos são cultivados com sobrenadantes de células apoptóticas. Os autores demonstraram que nesse modelo, a presença da proteína esfingosina-1-fosfato (S1P), foi responsável pelos efeitos observados.

No presente trabalho, investigamos a modulação da expressão da enzima HO-1 em macrófagos peritoneais infectados pelo *T. cruzi* e co-cultivados com células apoptóticas *in vitro*, e avaliamos o crescimento do parasita, assim como a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios.

A importância da indução da enzima HO-1 já foi demonstrada em outras infecções com parasitas intracelulares como *Plasmodium berghei* e *Plasmodium yoelii* (PAMPLONA *et al.*, 2007; EPIPHANIO *et al.*, 2008). E nossos resultados revelaram que a infecção de macrófagos por este parasita, induziu uma expressão basal dessa enzima, enquanto que a interação de macrófagos infectados ou não pelo parasita, co-cultivados com células apoptóticas foi capaz de induzir o aumento da expressão da HO-1. No presente trabalho demonstrou pela primeira vez que a atividade da enzima HO-1, é aumentada, quando macrófagos murinos infectados pelo *T. cruzi* quando co-cultivados com células apoptóticas. Esta atividade foi relacionada com a

proliferação das formas amastigotas intracelulares, resultando mais tarde em uma maior liberação de formas tripomastigotas presentes nos sobrenadantes das monocamadas de macrófagos infectados.

Nós observamos o favorecimento da replicação dos parasitas intracelulares quando houve o contato dos macrófagos infectados com células apoptóticas. Verificamos também, efeito semelhante na exacerbação da replicação do *T. cruzi in vitro*, quando foi adicionado o indutor da HO-1 (CoPPIX) usado como controle positivo. A confirmação desses dados foi obtida quando utilizamos o inibidor da HO-1 (SnPPIX) juntamente com células apoptóticas. Nesse sistema observamos uma redução no número de parasitas, quando comparados ao observado na presença das células apoptóticas sozinhas.

Diferente das enzimas HO-2 e HO-3 que são constitutivamente expressas, em condições fisiológicas normais, a maioria das células expressam baixos ou níveis indetectáveis da enzima HO-1 (WAGENER *et al.*, 2003). Entretanto, a expressão da HO-1 pode ser induzida por diferentes estímulos (DESHANE *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007; CHUNG *et al.*, 2009). A ativação da HO-1 está envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos por apresentar atividade citoprotetora, ou devido ao seu papel modulador na inflamação (OTTERBEIN *et al.*, 2000; RICCHETTI *et al.*, 2004). Nossos resultados estão de acordo com o anteriormente observado que mostram o papel imunomodulador da HO-1 (KIM *et al.*, 2006; OROZCO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2009; WEISS *et al.*, 2009). No modelo utilizado, a indução da enzima HO-1 favoreceu a produção de fatores anti-inflamatórios como TGF- β , IL-10 e PGE₂, e inibiu a produção de TNF- α bem como do NO. Estes resultados estão de acordo com os achados prévios do nosso grupo que detectaram a produção desses fatores anti-inflamatórios no sistema de co-cultivo de macrófagos infectados pelo *T. cruzi* e células apoptóticas (FREIRE-DE-LIMA, *et al.*, 2000).

Quando adicionamos o inibidor do HO-1, o SnPPIX, nas nossas culturas, a produção dos fatores TGF- β e PGE₂, foi bloqueada.

O TGF- β é reconhecidamente o principal mediador anti-inflamatório produzido por macrófagos em resposta a fagocitose de células apoptóticas, ou lipossomos, contendo fosfatidilserina (FADOK *et al.*, 1998b; HUYNH *et al.*, 2002; HOFFMAN *et al.*, 2005; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2008). A utilização de anticorpo neutralizante desta citocina, ou a utilização de linhagens celulares que não expressam o receptor II para o TGF- β não apresentam os efeitos supressores mediados pela fagocitose das células apoptóticas em modelos *in vitro* e *in vivo* (HUYNH *et al.*, 2002; HOFFMAN *et al.*, 2005; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006).

A expressão de iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual (CERQUEIRA *et al.*, 2002). A indução da iNOS é regulada positivamente por citocinas pró-inflamatórias e negativamente por citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β e a IL-10. O NO resultante da ativação de iNOS tem capacidade tripanocida em macrófagos infectados (DOSREIS & LOPES, 2000; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006).

Para verificarmos se a liberação do *Trypanosoma cruzi* pelo indutor da HO-1 era dependente de TGF- β , utilizamos um anticorpo neutralizante dessa citocina nas culturas de macrófagos infectados, e verificamos que houve uma diminuição do número dos tripomastigotas liberados. Adicionalmente, confirmamos os achados de Freire-de-Lima e colaboradores (2000) que observaram que a neutralização do TGF- β nas culturas de macrófagos infectados co-cultivados com células apoptóticas também foi capaz de reduzir o número de parasitas. Esses

dados sugerem que a liberação do *T. cruzi* parece ser dependente de TGF- β produzido por macrófagos em resposta ao indutor da HO-1.

O papel dos mediadores TNF- α e NO está intimamente relacionado com processos inflamatórios e com a atividade microbicida de macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1992b; OSWALD *et al.*, 1992; OSWALD & JAMES, 1996). No presente trabalho não foi possível detectar a produção de TNF- α e NO, quando os macrófagos foram estimulados com células apoptóticas, ou na presença do ativador da HO-1 (CoPPIX). Quando os macrófagos foram estimulados com LPS/INF- γ e a essas culturas foram adicionadas células apoptóticas, ainda assim não foi possível verificar a produção desses fatores pró-inflamatórios. Já a inibição da HO-1 pela SnPPIX, promoveu a secreção de TNF- α e NO em macrófagos ativados com LPS/INF- γ , mesmo quando o inibidor estava na presença de células apoptóticas.

Ainda existe muita especulação em relação ao papel apresentado pela biliverdina e bilirrubina, dois dos produtos gerados pela degradação do heme pela HO-1. Tem sido proposto que a ação citoprotetora da BV e BR parece contribuir para o efeito benéfico da HO-1 contra uma variedade de doenças inflamatórias. Essa hipótese tem sido sugerida pela observação de que quando ocorre administração exógena de BV e BR, observa-se uma proteção nos modelos de lesão de isquemia e reperfusão, de rejeição de órgãos transplantados, e na sepse severa, assim como em lesões vasculares associados com o desenvolvimento de hiperplasia (revisto por GOZZELINO *et al.*, 2010).

Como o presente trabalho mostrou o envolvimento da HO-1 e como essa enzima é responsável por catalisar o heme em CO, Fe²⁺, BV e BV, decidimos averiguar se esses dois últimos produtos poderiam modular o crescimento do *T. cruzi* no neste modelo experimental *in*

vitro, assim como modular a produção de fatores pró ou anti-inflamatórios. De maneira semelhante ao observado quando células apoptóticas eram co-cultivadas com macrófagos infectados pelo *T. cruzi*, o tratamento com BV e BR também favoreceu a multiplicação de formas amastigotas intracelulares e, conseqüentemente a liberação de formas tripomastigotas nos sobrenadantes das monocamadas de macrófagos infectados. O aumento da produção do TGF- β também estava associado ao crescimento de parasitas induzido pela BV e BR. Como já mencionado anteriormente, essa citocina atua como desativadora de macrófagos propiciando a multiplicação do parasito (FADOK *et al.*, 1998; McDONALD *et al.*, 1999; HUYNH *et al.*, 2002; HOFFMAN *et al.*, 2005; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006). Como esperado, a adição dos produtos BV ou BR nas culturas de macrófagos infectados, não foram suficientes para induzir a produção de TNF- α e NO, porém, estes estímulos foram capazes de inibir a produção destes dois mediadores inflamatórios, por macrófagos murinos infectados pelo *T. cruzi* cultivados na presença LPS/IFN- γ . Estes resultados descrevem pela primeira vez, a produção de citocinas anti-inflamatórias por macrófagos tratados com BV e BR. A participação do CO e do Fe²⁺ em nosso sistema experimental ainda precisa ser elucidado.

Recentemente, Kronke e colaboradores (2007), descreveram a participação do PPAR- γ na ativação da HO-1 por células endoteliais humanas. A ativação do PPAR- γ , um receptor nuclear ativado por ligantes, tem sido implicada com diversos mediadores anti-inflamatórios (ZINGARELLI & COOK, 2005). A expressão do PPAR- γ em macrófagos murinos induzida pela fagocitose de células apoptóticas, ou pelo tratamento com lipossomos contendo PS, já foi caracterizada (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006; JOHANN *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2007). Com base nesses dados, avaliamos o possível envolvimento do PPAR- γ na modulação da do

crescimento do *T. cruzi*, induzido pela ativação da HO-1 em macrófagos peritoneais infectados. Nossos resultados demonstraram, que o antagonista de PPAR- γ (GW9662), reduziu de forma marcante o número de parasitos, induzida pela fagocitose ou pelo tratamento com CoPPIX . Estes resultados sugerem, que o PPAR- γ e a HO-1 podem estar participando do mecanismo imunossupressor induzido pela fagocitose de células apoptóticas.

Os nossos resultados demonstram pela primeira vez, que a expressão da HO-1 por macrófagos, pode ser aumentada pela fagocitose de células apoptóticas, e desta maneira modular o perfil de mediadores pró e anti-inflamatórios, favorecendo a produção dos fatores anti-inflamatórios, resultando assim, no favorecimento da replicação de parasitos intracelulares, como o *T. cruzi*. Os efeitos imunomoduladores descritos em nossos resultados, também podem ser mediados pelo uso dos produtos gerados a partir da degradação do heme pela HO-1, como BV e BR. Por último, nossos dados também sugerem que o receptor nuclear PPAR- γ pode estar envolvido nestes mecanismos de modulação, atuando como um ativador e/ou amplificador da ativação da HO-1 por macrófagos infectados pelo *T. cruzi* que fagocitaram células apoptóticas.

6. CONCLUSÕES

- ❖ A indução da HO-1 pela fagocitose de células apoptóticas, exacerbou o crescimento parasitos.
- ❖ A produção de fatores anti-inflamatórias (TGF- β , IL-10 e PGE₂), e inibição de citocina inflamatória (TNF- α) e do fator microbicida (NO) também foi observada pela indução da HO-1 através da fagocitose de células apoptóticas.
- ❖ O crescimento do *T. cruzi* nas culturas foi dependente de TGF- β produzido por macrófagos em resposta a HO-1.
- ❖ Os sub-produtos da degradação do heme pela enzima HO-1, biliverdina e bilirrubina, também favoreceram o crescimento dos parasitos, pelo aumento de fatores anti-inflamatórios (TGF- β , IL-10 e PGE-2) e diminuição dos fatores pró-inflamatórios.
- ❖ A BV e BR não induziram a produção de TNF- α e NO pelos macrófagos infectados pelo *T. cruzi*.
- ❖ A inibição do crescimento dos parasitas, em macrófagos tratados com células apoptóticas ou com o indutor da HO-1 estava relacionado com o bloqueio do PPAR- γ pelo seu antagonista, GW9662.

MODELO PROPOSTO

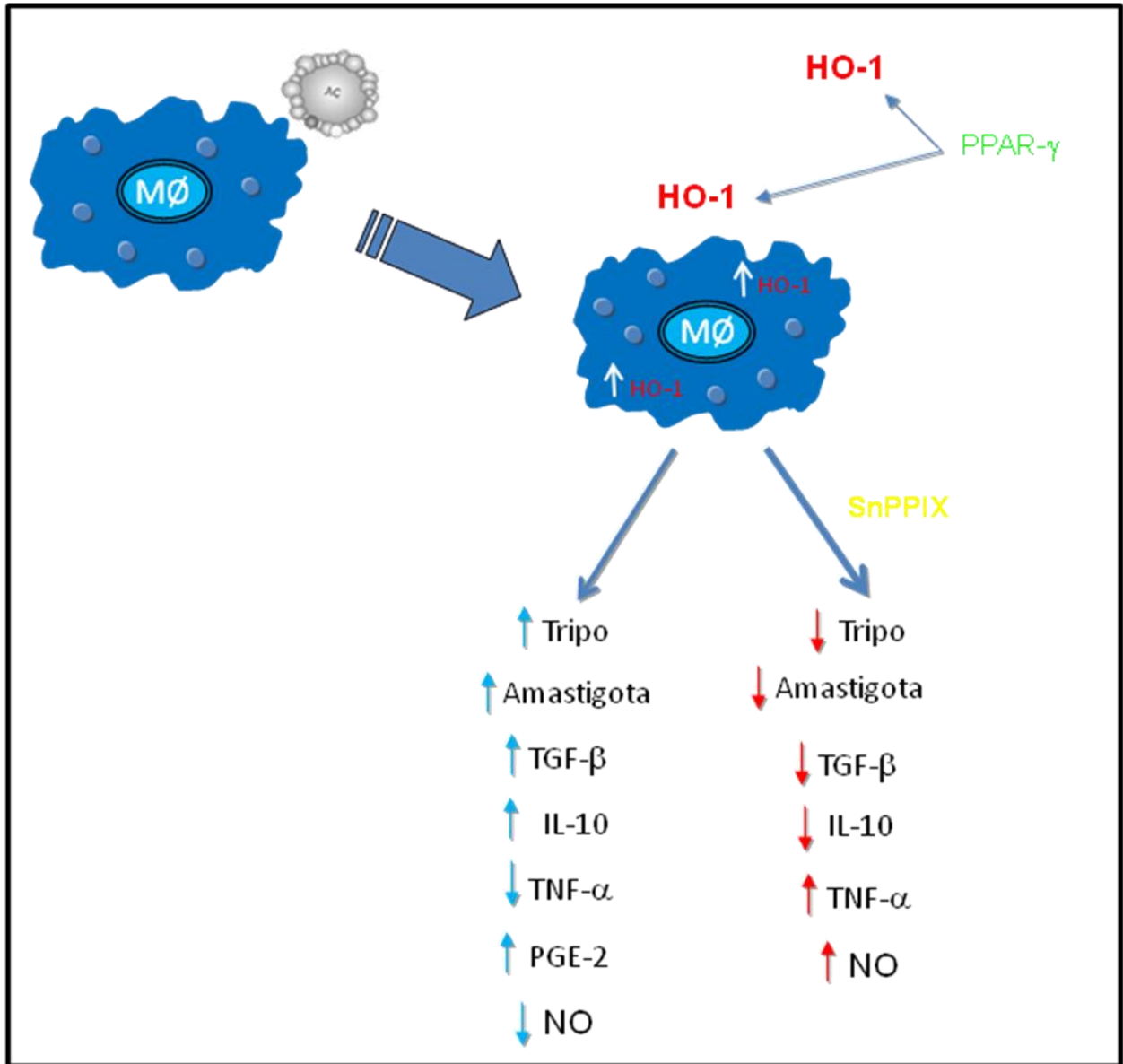


Figura 17: Participação da Heme-oxigenase-1 na infecção de macrófagos pelo *Trypanosoma cruzi*: modulação pela fagocitose de células apoptóticas. A fagocitose de células apoptóticas induz o aumento da expressão da enzima HO-1, que por sua vez favorece o aumento do número de amastigotas, bem como de tripomastigotas liberados na cultura, favorece o aumento de fatores anti-inflamatórios como TGF- β , IL-10 e PGE₂ e diminuição de fatores pró-inflamatórios como TNF- α e fator microbicida NO. Por outro lado, a inibição da HO-1 (utilizando inibidor da HO-1, SnPPIX) acarreta a diminuição de tripomastigotas liberados na cultura, replicação de amastigotas, e produção de fatores anti-inflamatórios e promove o aumento da produção de fatores pró-inflamatórios. Sugerimos uma participação do PPAR- γ na ativação e/ou ativação da HO-1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, N. G., FRIEDLAND, M. L., LEVERE, R. D., 1983. Heme metabolism in hepatic and erythroid. *Progress in Hematology* (Brown E ed), Grune & Stratton Inc. (G&S) p.75-130

ABRAHAMSOHN, I. A. e COFFMAN, R. L. 1995 Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, v.155, n.8 p.3955-63.

AKIRA, S. 2006 TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, v.311 p.1-16.

ALAM, J., SHIBAHARA, S. e SMITH, A. 1989 Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J Biol Chem*, v.264, n.11 p.6371-5.

ALIBERTI, J. C., CARDOSO, M. A., MARTINS, G. A., GAZZINELLI, R. T., VIEIRA, L. Q. e SILVA, J. S. 1996 Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypanomastigotes. *Infect Immun*, v.64, n.6 p.1961-7.

ANDRADE, Z. A. 1991 Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol*, v.142, n.2 p.126-9.

BARRETO, M. P., 1979. Epidemiologia. Em: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A. (Eds). *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara koogan, p. 89-291.

BELTZ, L. A., SZTEIN, M. B. e KIERSZENBAUM, F. 1988 Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 receptor expression. *J Immunol*, v.141, n.1 p.289-94.

BERI, R. & CHANDRA, R. 1993 Chemistry and biology of heme. 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*, v.25, n.1-2 p.49-152.

BRENER, Z. 1982 Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bull World Health Organ*, v.60, n.4 p.463-73.

BRENER, Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 266-296, 2000.

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

BROUARD, S., BERBERAT, P. O., TOBIASCH, E., SELDON, M. P., BACH, F. H. e SOARES, M. P. 2002 Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, v.277, n.20 p.17950-61.

BURLEIGH, B. A. & ANFREWS, N. W., 1995. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, v.10, n.270 p. 5172-80.

CAMHI, S. L., ALAM, J., WIEGAND, G. W., CHIN, B. Y. e CHOI, A. M. 1998 Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.18, n.2 p.226-34.

CAO, J., DRUMMOND, G., INOUE, K., SODHI, K., LI, X. Y. e OMURA, S. 2008 Upregulation of Heme Oxygenase-1 Combined with Increased Adiponectin Lowers Blood Pressure in Diabetic Spontaneously Hypertensive Rats through a Reduction in Endothelial Cell Dysfunction, Apoptosis and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*, v.9, n.12 p.2388-406.

CHAGAS, C., 1909. Nova Tripanosomiase humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, n.1 p.159-218.

CERQUEIRA, N. F. & YOSHIDA, W. B., 2002. Óxido Nítrico. Revisão. *Acta Cir. Bras.* v. 17, n.6 p. 417-423.

CHEN, J. J. & LONDON, I. M., 1981. Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell.*, v.26 p.117-122.

CHUNG, S.W., LIU, X, MACIAS, A.A, BARON, RM, PERRELA, MA, 2008. Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice, *J Clin Invest*, v.118, n.1 p. 239-47.

CHUNG, S. W., HALL, S. R., PERRELLA, M. A., 2009. Role of haem oxygenase-1 in microbial defence. *Microbiology*, v.11, n.2 p.199-207.

CICCARELLI, A., ARAUJO, L., BATLLE, A., LOMBARDO, E., 2007. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. v. 134, n.7 p.959-65.

CONTERAS, V. T., SALLES, J. M., THOMAS, M., MOREL, C. M., GOLDENBERG, S., 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitology*, v.16, n.3 p.315-27.

CONTRERAS, V. T., ARAUJO-JORGE, T. C., BONALDO, M. C., THOMAZ, BARBOSA, H. S., MEIRELLES, M. N. S. L., GOLDENBERG, S., 1988. Biological aspects of the DM28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*. V.83, n.1 p.123-133.

COURA, J. R., WILLCOX, H. P., TAVARES, A. M., DE PAIVA, D. D., FERNANDES, O., RADA, E. L., PEREZ, E. P., BORGES, L. C., HIDALGO, M. E. e NOGUEIRA, M. L. 1994 Epidemiological, social, and sanitary aspects in an area of the Rio Negro, State of Amazonas, with special reference to intestinal parasites and Chagas' disease]. *Cad Saude Publica*, v.10 Suppl 2 p.327-36.

DESHANE, J., WRIGHT, M. e AGARWAL, A. 2005 Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol*, v.52, n.2 p.273-84.

DESHANE, J., WRIGHT, M. e AGARWAL, A. 2005 Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol*, v.52, n.2 p.273-84.

DIAS, E., LARANJA, F.S., MIRANDA, A., NOBREGA, G., 1956. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 14(6): 1035-1060.

DIAS, J. C. P., 1988. Reseña histórica de los conocimientos sobre La enfermedad de Chagas y reflexiones sobre algunos aspectos políticos y sócio-económicos de La endemia em el contexto latinoamericano. *Rev Feder Argent Cardiol.*, v.29, p.129-135.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas In: CIMERMAN, B. CIMERMANN, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo:Editora Atheneu, p. 81-110, 1999.

DIAS, J. C., SILVEIRA, A. C. e SCHOFIELD, C. J. 2002 The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.97, n.5 p.603-12.

DUCATI, R., RUFFINO-NETO, A., BASSO, L. A., SANTOS, S. D., 2006. The resumption of consumption – A review on Tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v.101 p.697-714.

EPIPHANIO, S., MIKOLAJCZAK, S. A., GONCALVES, L. A., PAMPLONA, A., PORTUGAL, S., ALBUQUERQUE, S., GOLDBERG, M., REBELO, S., ANDERSON, D. G., AKINC, A., VORNLOCHER, H. P., KAPPE, S. H., SOARES, M. P. e MOTA, M. M. 2008 Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. *Cell Host Microbe*, v.3, n.5 p.331-8.

ERWING, L. P., HENSON, P. M., 2007. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol*, v. 171, n1 p.2-8.

FADOK, V. A., VOELKER, D. R., CAMPBELL, P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L. e HENSON, P. M. 1992 Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, v.148, n.7 p.2207-16.

FADOK, V. A., BRATTON, D. L., KONOWAL, A., FREED, P. W., WESTCOTT, J. Y. e HENSON, P. M. 1998 Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit

proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE₂, and PAF. *J Clin Invest*, v.101, n.4 p.890-8.

FADOK, V. A., BRATTON, D. L., KONOWAL, A., FREED, P. W., WESTCOTT, J. Y., HENSON, P. M., 1998b. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE₂, and PAF. *J Clin Invest*, v.15, n.4 p.890-8.

FADOK, V. A., BRATTON, D. L., HENSON, P. M., 2001. Phagocyte receptor for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin Invest*, v.108, n.7 p.957-62.

FORESTI, R., CLARK, J. E., GREEN, C. J. e MOTTERLINI, R. 1997. Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells. Involvement of superoxide and peroxynitrite anions. *J Biol Chem*, v.272, n.29 p.18411-7.

FREIRE-DE-LIMA, C. G., NASCIMENTO, D. O., SOARES, M. B., BOZZA, P. T., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., DE MELLO, F. G., DOSREIS, G. A. e LOPES, M. F. 2000 Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*, v.403, n.6766 p.199-203.

FREIRE-DE-LIMA, C. G., XIAO, Y. Q., GARDAI, S. J., BRATTON, D. L., SCHIEMANN, W. P. e HENSON, P. M. 2006 Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem*, v.281, n.50 p.38376-84.

GARDAI, S. J., BRATTON, D. L., OGDEN, C. A., HENSON, P. M., 2006. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *Journal of Leukocyte Biology*, v.75 p.896-903.

GAZZINELLI, R. T., OSWALD, I. P., HIENY, S., JAMES, S. L. e SHER, A. 1992 The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*, v.22, n.10 p.2501-6.

GAZZINELLI, R. T., OSWALD, I. P., JAMES, S. L., SHER, A. L., 1992b. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *Journal of Immunology*, v.148, n.6 p.1792-6.

GEWIES, A., 2003. Introduction to apoptosis. *Apo Review*. p.1-26.

GIDARI, A. S. & LEVERER, R. D., 1977. Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis. *Semin Hemathol.*, v.14 p.145-168.

GLASS, C. K. & OGAWA, S. 2006 Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, v.6, n.1 p.44-55.

- GORDON, S., 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, v.3 p.23-35.
- GOZZELINO, R., JENEY, V. e SOARES, M. P., 2010. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.50 p.323-54.
- GUIMONT-DESROCHERS, F., BEAUCHAMP, C., CHABOT-ROY, G., DUGAS, V., HILLHOUSE, E. E., DUSSEAULT, J., LANGLOIS, G., GAUTIER-ETHIER, P., DARWICHE, J., SARFATI, M. e LESAGE, S. 2009 Absence of CD47 in vivo influences thymic dendritic cell subset proportions but not negative selection of thymocytes. *Int Immunol*, v.21, n.2 p.167-77.
- HAREL-BELLAN, A., JOSKOWICZ, M., FRADELIZI, D. e EISEN, H. 1983 Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.80, n.11 p.3466-9.
- HAREL-BELLAN, A., JOSKOWICZ, M., FRADELIZI, D. e EISEN, H. 1985 T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2. *Eur J Immunol*, v.15, n.5 p.438-42.
- HAYASHI, S., TAKAMIYA, R., YAMAGUCHI, T., MATSUMOTO, K., TOJO, S. J., TAMATANI, T., KITAJIMA, M., MAKINO, N., ISHIMURA, Y. e SUEMATSU, M. 1999 Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res*, v.85, n.8 p.663-71.
- HENSON, P. M. & HUME, D. A., 2006. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunology*, v.27, n.5 p.244-50.
- HU, A. P., DU, J. M., LI, J. Y., LIU, J. W., 2008. Oridonin promotes CD4+/CD25+ T reg differentiation, modulates Th1/Th2 balance and induces HO-1 in rat splenic lymphocytes. *Inflamm Res*, v.57, n.4 p.163-70.
- HUNTER, C. A., ELLIS-NEYES, L. A., SLIFER, T., KANALY, S., GRUNIG, G., FORT, M., RENNICK, D. e ARAUJO, F. G. 1997 IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, v.158, n.7 p.3311-6.
- HUYNH, M. N., FADOK, V. A. & HENSON, P. M., 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.*, v.1, n.109 p.41-50.
- ISSEMANN, I. e GREEN, S. 1990 Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, v.347, n.6294 p.645-50.
- JOHANN, A. M., VON KNETHEN, A., LINDEMANN, D. e BRUNE, B. 2006 Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst. *Cell Death Differ*, v.13, n.9 p.1533-40.

JOZKOWICZ, A., HUK, I., NIGISCH, A., WEIGEL, G., WEIDINGER, F. e DULAK, J. 2002 Effect of prostaglandin-J(2) on VEGF synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal*, v.4, n.4 p.577-85.

KAPTURCZAK, M. H., WASSERFALL, C., BRUSKO, T., CAMPBELL-THOMPSON, M., ELLIS, T. M., ATKINSON, M. A. e AGARWAL, A. 2004 Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol*, v.165, n.3 p.1045-53.

KERR, J. F., WYLLIE, A. H. e CURRIE, A. R. 1972 Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, v.26, n.4 p.239-57.

KIERSZENBAUM, F., MORETTI, E. e SZTEIN, M. B., 1991. Trypanosoma cruzi induces suppression of DNA synthesis and inhibits expression of interleukin-2 receptors by stimulated human B lymphocytes. *Immunology*, v.74, n.2 p.317-22.

KIM, B. C., CHOI, J. W., HONG, H. Y., LEE, S. A., HONG, S., PARK, E. H., KIM, S. J., LIM, C. J., 2006. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of mushroom *Phellinus linteus* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Ethnopharmacol.*, v.106, n.3 p.364-71.

KIM, Y. S., PI, S. H., LEE, Y. M., LEE, S. I., KIM, E. C., 2009. The anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 in lipopolysaccharide and cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*, v.80, n.12 p.2045-55.

KRETTI, A. U., BRENER, Z., 1982. Resistance against Trypanosoma cruzi associated to anti-living trypomastigote antibodies. *Journal of immunology*, v.128, n.5 p.2009-12.

KRONKE, G., KADL, A., IKONOMU, E., BLUML, S., FURNKRANZ, A., SAREMBOCK, I. J., BOCHKOV, V. N., EXNER, M., BINDER, B. R. e LEITINGER, N. 2007 Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.27, n.6 p.1276-82.

KUMAR, S. & TARLETON, R. L. 1998 The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi. *Parasite Immunol*, v.20, n.5 p.207-16.

KUMAR, A., DESHANE, J., CROSSMAN, D. K., BOLISETTY, S., YAN, B., KRAMNIK, I., AGARWAL, A., STEYN, A. J. C., 2008. Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide induces the Mycobacterium tuberculosis dormancy regulon. *The Journal of Biological Chemistry.*, v.283, n.26 p.18032-18039.

KUNSCH, C., LUCHOOMUN, J., GREY, J. Y., OLLIFF, L. K., SAINT, L. B., ARRENDALE, R. F., WASSERMAN, M. A., SAXENA, U. e MEDFORD, R. M. 2004 Selective inhibition of

endothelial and monocyte redox-sensitive genes by AGI-1067: a novel antioxidant and anti-inflammatory agent. *J Pharmacol Exp Ther*, v.308, n.3 p.820-9.

LAVROVSKY, Y., SCHWARTZMAN, M. L., LEVERE, R. D., KAPPAS, A. e ABRAHAM, N. G. 1994 Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.91, n.13 p.5987-91.

LEE, P. J., ALAM, J., SYLVESTER, S. L., INAMDAR, N., OTTERBEIN, L. e CHOI, A. M. 1996 Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.14, n.6 p.556-68.

LEE, T. S. e CHAU, L. Y. 2002 Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med*, v.8, n.3 p.240-6.

LI, C., HOSSIENY, P., WU, B. J., QAWASMEH, A., BECK, K., STOCKER, R., 2007. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal*, v.9, n.12 p.2227-39.

LIEW, F.Y., MILLOT, S., PARKINSON, C., PALMER, R.M.J., MONCADA, S., 1990 Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. v.144 p.4794 –4797.

LOCKSHIN, R. A. & WILLIAMS, C. M., 1964. Programmed cell death – II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, v.10, n.4 p.643-649.

LOPES, M. F., DA VEIGA, V. F., SANTOS, A. R., FONSECA, M. E. e DOSREIS, G. A. 1995 Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol*, v.154, n.2 p.744-52.

LOPES, M. F, CUNHA, J. M. T., BEZERRA, F. L., GONZALES, M. S., GOMES, J. E. L., ESILVA, J. R. L., GARCIA, E. S., DOSREIS, G. A., 1995b. Experimental Chagas' disease: Both Chemically Induced and Triatomine derived metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* cause similar immunological alterations in the infected host. *Experimental Parasitology*, v.8, p.194-204.

LOPES, M. F. & DOSREIS, G. A. 1996 *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: selective triggering of CD4+ T-cell death by the T-cell receptor-CD3 pathway and not by the CD69 or Ly-6 activation pathway. *Infect Immun*, v.64, n.5 p.1559-64.

LOPES, M. F., NUNES, M. P., HENRIQUES-PONS, A., GIESE, N., MORSE, H. C., 3RD, DAVIDSON, W. F., ARAUJO-JORGE, T. C. e DOSREIS, G. A. 1999 Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. *Eur J Immunol*, v.29, n.1 p.81-9.

LOPES, M. F. & DOSREIS, G. A. 2000 Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. *Apoptosis*, v.5, n.3 p.221-4.

____ LOPES & DOSREIS, 2000. In: capítulo 9: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Rio de Janeiro, segunda edição. Ed. Guanabara Koogan.

MAINES, M. D. 1997 The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.37 p.517-54.

MAINES, M. D., POLEVODA, B., COBAN, T., JOHNSON, K., STOLIAR, S., HUANG, T. J., PANAHIAN, N., CORY-SLECHTA, D. A. e MCCOUBREY, W. K., JR. 1998 Neuronal overexpression of heme oxygenase-1 correlates with an attenuated exploratory behavior and causes an increase in neuronal NADPH diaphorase staining. *J Neurochem*, v.70, n.5 p.2057-69.

MARTINEZ, F. O., SICA, A., MANTOVANI, A. e LOCATI, M. 2008 Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, v.13 p.453-61.

MINOPRIO, P., ITOHARA, S., HEUSSER, C., TONEGAWA, S. e COUTINHO, A. 1989 Immunobiology of murine T. cruzi infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev*, v.112 p.183-207.

MONCAYO, A. 1997 Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *World Health Stat Q*, v.50, n.3-4 p.195-8.

MONCAYO, A, 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusion transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, n.5 p.577-91.

MORSE, D. & CHOI, A. M. 2005 Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med*, v.172, n.6 p.660-70.

MOTTERLINI, R., FORESTI, R., BASSI, R., CALABRESE, V., CLARK, J. E. e GREEN, C. J. 2000 Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem*, v.275, n.18 p.13613-20.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A., FERNANDEZ, M. A. e FRESNO, M. 1992 Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett*, v.33, n.1 p.35-40.

NAGAOSA, K., SHIRATSUCHI, A. e NAKANISHI, Y. 2003 Concomitant induction of apoptosis and expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured rat luteal cells by nuclear factor-kappaB and oxidative stress. *Dev Growth Differ*, v.45, n.4 p.351-9.

NUNES, M. P., ANDRADE, R. M., LOPES, M. F. e DOSREIS, G. A. 1998 Activation-induced T cell death exacerbates Trypanosoma cruzi replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *J Immunol*, v.160, n.3 p.1313-9.

OROZCO, L. D., KAPTURCZAK, M. H., BARAJAS, B., WANG, X., WEINSTEIN, M. M., WONG, J., DESHANE, J., BOLISSETTY, S., SHAPOSHNIK, Z., SHIH, D. M., AGARWAL, A., LUSIS, A. J., ARAUJO, J. A., 2007. Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ Res.*, v.100, n.12 p.1703-11.

OSWALD, I. P., WYNN, T. A., SHER, A. e JAMES, S. L. 1992 Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, n.18 p.8676-80.

OSWALD, I. P., JAMES, S. L., 1996. Nitrogen Oxide in host defense against parasites. *Methods*, v.10, n.1 p.8-14.

OTTERBEIN, L. E., BACH, F. H., ALAM, J., SOARES, M., TAO LU, H., WYSK, M., DAVIS, R. J., FLAVELL, R. A. e CHOI, A. M. 2000 Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*, v.6, n.4 p.422-8.

PAE, H. O., OH, G. S., CHOI, B. M., CHAE, S. C. e CHUNG, H. T. 2003 Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.306, n.3 p.701-5.

PAIDASSI, H., TACNET-DELORME, P., ARLAUD, G. J. e FRACHET, P. 2009 How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. *Crit Rev Immunol*, v.29, n.2 p.111-30.

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

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. P. & MULLER, C. A., 1982. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. I: Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . v. 77, p. 37-53.

PHAM, N. K., MOURIZ, J., KIMA, P. E., 2005. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infection and Immunity*, v.73, n.12 p.8322-8333.

PLATT, N., DA SILVA, R. P. e GORDON, S. 1998 Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*, v.8, n.9 p.365-72.

PONKA, P. 1999 Cell biology of heme. *Am J Med Sci*, v.318, n.4 p.241-56.

PORTO, B. N., ALVES, L. S., FERNANDEZ, P. L., DUTRA, T. P., FIGUEIREDO, R. T., GRACA-SOUZA, A. V. e BOZZA, M. T. 2007 Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem*, v.282, n.33 p.24430-6.

POSS, K. D. & TONEGAWA, S. 1997 Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.20 p.10919-24.

PRATA, A. 2001 Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, v.1, n.2 p.92-100.

RAMOS, C. G., FERNANDES, D., CHARÃO, C. T., SOUZA, D. G., TEIXEIRA, M. M., ASSEUY, J., 2007. Apoptotic mimicry: phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) *in vivo*. *J. Br J Pharmacol*, v. 151, n.6 p.844-50.

RICCHETTI, G. A., WILLIAMS, L. M., FOXWELL, B. M., 2004. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol.*, v. 76, n. 3 p.719-26.

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

SAVILL, J., GREGORY, C. e HASLETT, C. 2003 Cell biology. Eat me or die. *Science*, v.302, n.5650 p.1516-7.

SEED, M. P. & WILLOUGHBY, D. A., 1997. Cyclooxygenase-2, heme oxygenase and nitric oxide synthase: their role and interactions in inflammation. BIRA Symposium, Saint Bartholomew's Hospital, London. *Inflamm Res.*, v.46 p.279-281.

SCOTT, R. S., MCMAHON, E. J., POP, S. M., REAP, E. A., CARICCHIO, R., COHEN, P. L., EARP, H. S. e MATSUSHIMA, G. K. 2001 Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, v.411, n.6834 p.207-11.

SHIBAHARA, S., MULLER, R. M. e TAGUCHI, H. 1987 Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem*, v.262, n.27 p.12889-92.

SHIBAHARA, S., NAKAYAMA, M., KITAMURO, T., UDONO-FUJIMORI, R. e TAKAHASHI, K. 2003 Repression of heme oxygenase-1 expression as a defense strategy in humans. *Exp Biol Med (Maywood)*, v.228, n.5 p.472-3.

SHILOH, M. U., MANZANILLO, P. e COX, J. S. 2008 Mycobacterium tuberculosis senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection. *Cell Host Microbe*, v.3, n.5 p.323-30.

SILVA, J. S., MORRISSEY, P. J., GRABSTEIN, K. H., MOHLER, K. M., ANDERSON, D. e REED, S. G. 1992 Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. *J Exp Med*, v.175, n.1 p.169-74.

SOARES, M. B., PONTES-DE-CARVALHO, L., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., 2001. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune response meet. *An Acad Bras. Cienc.*, v.18, n.2 p.131-8.

SOARES, M. P., SELDON, M. P., GREGOIRE, I. P., VASSILEVSKAIA, T., BERBERAT, P. O., YU, J., TSUI, T. Y. e BACH, F. H. 2004 Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol*, v.172, n.6 p.3553-63.

SONG, R., NING, W., LIU, F., AMEREDES, B. T., CALHOUN, W. J., OTTERBEIN, L. E. e CHOI, A. M. 2003 Regulation of IL-1beta -induced GM-CSF production in human airway smooth muscle cells by carbon monoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v.284, n.1 p.L50-6.

SOONG, L., & TARLETON, R. L., 1992. Selective suppressive effects of Trypanosoma cruzi infection on IL-2, c-myc, and c-fos gene expression. *Journal of Immunology*, v.149, n.6 p.2095-102.

STEIN, M., KESHAV, S., HARRIS, N., GORDON, S., 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.*, v.176 p.287-292.

STEINDEL, M., DIAS, J. C. & ROMANHA, A. J., 2005. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. *Ciência Hoje*, v.37, p.32-38.

STEMPIN, C. C., TANOS, T. B., COSO, O. A., CERBÁN, F. M., 2004. Arginase induction promotes Trypanosoma cruzi intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathway. *Eur. J. Immunol.*, v.34, n.1 p.200-9.

STEMPIN, C. C., DULGERIAN, L. R., GARRIDO, V. V., CARBAN, F. M., 2010. Arginase in parasitic infection: immunosuppression, and intracellular signals., *J. Biomed Biotechnol.*, 2010:683485.

TAKAKI, S., TAKEYAMA, N., KAJITA, Y., YABUTI, T., NOGUCHI, H., MIKI, 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.*, v.36, n.1 p.42-8.

TANOWITZ, H. B., MACHADO, F. S., JELICKS, L. A., SHIRANI, J., DE CARVALHO, A. C., SPRAY, D. C., FACTOR, S. M., KIRCHHOFF, L. V. e WEISS, L. M. 2009 Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis*, v.51, n.6 p.524-39.

- TARLETON, R. L., 1988 Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol*, v.140, n.8 p.2769-73.
- TARLETON, R. L., 1988 Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. *Clin Exp Immunol*, v.73, n.2 p.186-90.
- TARLETON, R. L. 1995 The role of T cells in Trypanosoma cruzi infections. *Parasitol Today*, v.11, n.1 p.7-9.
- TARLETON, R. L., GRUSBY, M. J., POSTAN, M. e GLIMCHER, L. H. 1996 Trypanosoma cruzi infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol*, v.8, n.1 p.13-22.
- TARLETON, R. L., 2007. Imuune system recognition of *Trypanossoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*, v.19, n.4 p.430-4.
- TEIXEIRA, A. R., NASCIMENTO, R. J. e STURM, N. R. 2006 Evolution and pathology in chagas disease-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, n.5 p.463-91.
- TERRY, C. M., CLIKEMAN, J. A., HOIDAL, J. R. e CALLAHAN, K. S. 1998 Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol*, v.274, n.3 Pt 2 p.H883-91.
- TERRY, C. M., CLIKEMAN, J. A., HOIDAL, J. R. e CALLAHAN, K. S. 1999 TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca²⁺, and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am J Physiol*, v.276, n.5 Pt 2 p.H1493-501.
- UMEZAWA, E. S., STOLF, A. M. S., CORBETT, C. E. P., SHIKANAI-YASUDA, 2000. Chagas' disease. *Lancet*, v.357 p.797-99.
- VANDIVIER, R. W., HENSON, P. M., DOUGLAS, I. S., 2006. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest*, v.129, n.6 p.1673-82.
- WAGENER, F. A., DA SILVA, J. L., FARLEY, T., DE WITTE, T., KAPPAS, A. e ABRAHAM, N. G. 1999 Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediated endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther*, v.291, n.1 p.416-23.
- WAGENER, F. A., FELDMAN, E., DE WITTE, T. e ABRAHAM, N. G. 1997 Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.216, n.3 p.456-63.

WAGENER, F. A., VOLK, H. D., WILLIS, D., ABRAHAM, N. G., SOARES, M. P., ADEMA, G. J. e FIGDOR, C. G. 2003 Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*, v.55, n.3 p.551-71.

WAHLI, W., BRAISSANT, O. e DESVERGNE, B. 1995 Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol*, v.2, n.5 p.261-6.

WATSON, C. G., 1965. Reminiscences of Hans Fischer and his laboratory. *Perspect Biol.*, v.8 p.419-435.

WEIS, N., WEIGERT, A., VON KNETHEN, A. e BRUNE, B. 2009 Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol Biol Cell*, v.20, n.5 p.1280-8.

WELSH, R. M., MCNALLY, J. M., 1999. Immune deficiency, immune silencing and clonal exhaustion of T cell responses during viral infections. *Curr. Opin Microbiol.*, v.2 p.382-387.

WILLIS, D., MOORE, A. R., FREDERICK, R. e WILLOUGHBY, D. A. 1996 Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med*, v.2, n.1 p.87-90.

WHO – World Health Organization. 2002. Chagas Disease

WHO – World Health Organization, 2010. Chagas Disease

XIAO, Y. Q., FREIRE-DE-LIMA, C. G., SCHIEMANN, W. P., BRATTON, D. L., VANDIVIER, R. W., HENSON, P. M., 2008. Transcriptional and translational regulation of TGF-beta production in response to apoptotic cells. *Journal of Immunology*, v.181, n.5 p.3575-85.

YACHIE, A., NIIDA, Y., WADA, T., IGARASHI, N., KANEDA, H., TOMA, T., OHTA, K., KASAHARA, Y. e KOIZUMI, S. 1999 Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, v.103, n.1 p.129-35.

ZHANG, X. e YOUNG, H. A. 2002 PPAR and immune system--what do we know? *Int Immunopharmacol*, v.2, n.8 p.1029-44.

ZIEGLER, U. e GROSCURTH, P. 2004 Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*, v.19 p.124-8.

ZINGARELLI, B. & COOK, J. A., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock*, v.23 p.393-399.

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](#)