

Daniel Ferreira Feijó

PAPEL DA HEME-OXIGENASE-1 NA INFECÇÃO POR
Trypanosoma cruzi



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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
JULHO DE 2010

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

Daniel Ferreira Feijó

Papel da heme-oxigenase-1 na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

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

A heme-oxigenase-1 (HO-1) é a isoforma induzida envolvida no catabolismo do heme, gerando íons ferro, monóxido de carbono (CO), e biliverdina, convertida logo em seguida em bilirrubina. Recentemente, o papel da indução de HO-1 na resistência às infecções intracelulares tem sido demonstrado em diversos estudos. Na presente tese, nós mostramos que a CoPP, um indutor de HO-1, reduziu a carga parasitária em macrófagos, como também a parasitemia e mortalidade em camundongos infectados. A droga CoPP não reduziu a viabilidade de formas tripomastigotas diretamente, indicando uma ação tripanocida da CoPP através de mecanismos imunológicos. CoPP não interferiu ou aumentou mecanismos tripanocidas conhecidos (atividade citolítica de células T CD8, polarização Th antígeno-específica, NO e TNF) e também não alterou a resposta apoptótica de linfócitos T pela infecção por *T. cruzi*. Não foi encontrada nenhuma evidência de que a HO-1 aumenta a fosforilação de IRF3 ou a produção de IFN- β , embora tenha sido observado um efeito parcial de CoPP dependente de IFNAR1. Antioxidantes como a NAC, ou os produtos do catabolismo de HO-1, como biliverdina e bilirrubina, também reduziram a carga parasitária de macrófagos. Drogas pro-oxidantes causaram a morte celular em macrófagos infectados, mas quando tratados concomitante com CoPP, os macrófagos sobreviveram, apresentando um aumento de carga parasitária. Mecanismos de defesa sensíveis ao estresse oxidativo, nos indicam uma possível explicação para os efeitos de CoPP em diminuir a infecção causada pelo *T. cruzi*. Estudos complementares serão feitos para avaliar a eficácia do tratamento de CoPP na fase crônica em modelo murino de infecção pelo *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, camundongo, HO-1, CoPP, macrófago, antioxidante e fase aguda.

Daniel Ferreira Feijó

The role heme-oxygenase-1 in the infection of *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

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

Heme oxygenase-1 is the inducible isoform of heme oxygenase involved on heme catabolism that generates Fe, carbon monoxide (CO) and biliverdin, later converted to bilirubin. The role of HO-1 induction in resistance to intracellular infections is emerging from a number of studies. Here we show that CoPP, a HO-1 inducer, reduced parasitic load in response to *Trypanosoma cruzi* infection of macrophages, as well as the parasitemia / mortality of infected mice. The drug failed to reduce trypomastigotes viability directly, indicating that it acts through immunological mechanisms. CoPP did not interfere with or did not enhance known trypanocidal mechanisms (CD8 cytolytic activity, antigen-specific Th polarization, NO and TNF production) and also did not alter the apoptotic response of T lymphocytes caused by *T. cruzi* infection. No evidences could be found to support the notion that HO-1 induction leads to IRF3 phosphorylation or IFN- β production, though a minor part of CoPP effects was dependent on the IFNAR1. Antioxidants such as NAC, or products of HO-1 pathway such as biliverdin and bilirubin also reduced parasitic load of macrophages. Pro-oxidants tended to cause infected cell death, but when administered along with CoPP, macrophages were able to survive, showing an increased parasite load. The cellular mechanisms of defense sensitive to oxidative stress offer an explanation of how CoPP effects reduces infection caused by *T. cruzi*. Further experiments will be made to evaluate the efficacy of the treatment of CoPP in the chronic phase in murine model of infection caused by *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. mouse, HO-1, CoPP, macrophage, antioxidant and acute phase.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Lista de abrevituras..... | 9 |
| INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1. Heme-oxigenase-1 (HO-1)..... | 12 |
| 1.1. Regulação de HO-1 | 14 |
| 1.2. HO-1 na inflamação | 16 |
| 1.3. Efeito imunomodulador da HO-1 | 19 |
| 1.4. O papel da HO-1 em infecções | 19 |
| 2. Doença de Chagas | 21 |
| 2.1. Fase aguda | 22 |
| 2.2. Fase crônica | 25 |
| 3. Hipótese | 28 |
| Objetivo Geral | 29 |
| Objetivos específicos..... | 29 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 1. Reagentes..... | 30 |
| 2. Animais | 30 |
| 3. Preparação de reagentes | 31 |
| 4. Infecção experimental | 31 |
| 5. Análise histológica de tecidos de camundongos infectados | 32 |
| 6. Isolamento de macrófagos peritoneais e diferenciação de cultura de células THP-1 | 32 |
| 7. Transfecção de células THP-1 | 33 |
| 8. Coleta de sobrenadante para dosagem de TNF e NO <i>in vitro</i> | 33 |
| 9. Quantificação da carga parasitária <i>in vitro e ex vivo</i> | 34 |
| 10. Quantificação da expressão gênica para <i>ifnb</i> | 35 |
| 11. Viabilidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> | 36 |
| 12. Análise de Western blott para expressão de HO-1 e IRF3 | 36 |
| 13. Reestímulo <i>ex vivo</i> de células peritoneais e esplenócitos | 37 |
| 14. Quantificação de óxido nítrico | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 15. Quantificação de citocinas por ELISA | 38 |
| 16. Perfil de apoptose e de linfócitos T em camundongos infectados | 38 |
| 17. Análise estatística..... | 39 |
| RESULTADOS..... | 40 |
| 1 – A CoPP aumenta a expressão de HO-1 em macrófagos infectados | 40 |
| 2 – A CoPP reduz a parasitemia e o parasitismo tissular em camundongos C57BL/6 | 42 |
| 3- A CoPP diminui a carga parasitária em macrófagos infectados de C57BL/6 e emTHP-1 | 44 |
| 4 - As metaloporfirinas não apresentaram efeito tripanocida direto..... | 47 |
| 5- O efeito microbicida da indução de HO-1 independe da geração de óxido nítrico (NO)..... | 51 |
| 6- O efeito microbicida da indução de HO-1 independe da secreção do fator de necrose tumoral (TNF). | 52 |
| 7 - O efeito tripanocida da CoPP é parcialmente dependente de atividade antioxidante | 54 |
| 8- O efeito tripanocida da CoPP depende parcialmente do IFNAR1 em macrófagos, mas não de PKR. | 57 |
| 9- O tratamento com CoPP diminui a celularidade no baço na infecção por <i>T. cruzi</i> , mas não interfere na apoptose em células T do baço..... | 60 |
| 10-O tratamento com CoPP não altera a resposta imune celular na infecção por <i>T. cruzi</i> | 62 |
| Discussão..... | 68 |
| Conclusões | 78 |
| Referências bibliográficas | 79 |

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AP - 2-aminopurina
AP-1 – proteína ativadora-1
ATP – adenosina trifosfato
BCR – receptor de linfócito B
BRB – bilirrubina
BVD – biliverdina
BVR – biliverdina redutase
CCL2 – ligante de quimiocina cisteína-cisteína 2
CD8 -/- - geneticamente deficiente em linfócitos T CD8
CLP – ligação de ceco por sutura
CO – monóxido de carbono
CoCl₂ – cloreto de cobalto
CoPP – cobalto protoporfirina
DC – célula dentrítica
DFO – deferoxamina
EAE – encefalomielite alérgica experimental
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
ERK – cinase reguladora de sinal extra-celular
FasR/FasL – Ligante de Fas/receptor Fas
GIPL – ceramida glicoinositolfosfolípido
GMPc – guanina monofosfato cíclico
gp91 phox -/- - geneticamente deficiente da subunidade gp91 da NADPH
GPI – glicosilfosfatidilinositol
GSH – glutationa reduzida
HBV – vírus da hepatite B
HCV – vírus da hepatite C
HIV – vírus da imunodeficiência humana
hmox1 -/- – geneticamente deficiente em HO-1
HO-1 – heme-oxigenase-1

HO-2 – heme-oxigenase-2
HO-3 - heme-oxigenase-3
HOIL-1 – proteína ubiquitina E3 responsiva de heme ligase
HRDs – domínios regulatórios de heme
HSP – proteína de choque térmico
ICAM – molécula integrina de adesão celular
IFNAR -/- - geneticamente deficiente no receptor de IFN do tipo I
IFN- α/β – linterferon-alfa/beta
IFN- γ – interferon-gama
IgM – imunoglobulina M
IL-10 – interleucina-10
IL-12 – interleucina-12
IL-17 – interleucina-17
IL-1 β – interleucina-1 beta
IL-2 – interleucina-2
IL-4 – interleucina-4
IL-6 – interleucina-6
iNOS -/- - geneticamente deficiente em óxido nítrico sintase induzida
IRF3 – fator de regulação de interferon-3
JNK – cinase cJun aminoterminal
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LPS – lipopolissacarídeo
LT- α – linfotoxina alfa
MAPK - proteína cinase ativada por mitógeno
MHC – complexo de histocompatibilidade principal
MIP-1 β – proteína inflamatória de macrófagos-1beta
MnSOD – manganês superóxido dismutase
MyD88 – fator de diferenciação mielóide do gene 88
NAC – n-acetilcisteína
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B – fator nuclear kappa B

NK – assassinas naturais
NO – óxido nítrico
Nod1 – domínio de oligomerização ligador de nucleotídeos 1
NOS2 -/- - geneticamente deficiente de óxido nítrico sintase-2
Nrf2 – fator nuclear relacionado-2
PAMP – padrão molecular associado a patógenos
PI3K - fosfatidilinositol-3-cinase
PKC – proteína cinase C
PKO -/- - geneticamente deficiente em perforina
PRR –receptor de reconhecimento de patógenos
RAG – gene ativador de recombinação
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
RNI – espécies reativas de nitrogênio
ROS – espécies reativas de oxigênio
SnPP – estanho protoporfirina
StRE – elemento de resposta a estresse
TCR – receptor de linfócito T
TGF- β – fator de crescimento de linfócito T
Th1 – auxiliar do tipo 1
Th2 – auxiliar do tipo 2
TLR – receptor do tipo toll
TNFR1 -/- - geneticamente deficiente do receptor R1 de TNF
TNF- α – fator de necrose tumoral-alfa
Treg – célula T regulatória
TRIF – receptor de domínio de proteína adaptadora Toll/IL-1
VCAM – molécula de adesão celular vascular
VEGF – fato de crescimento vascular endotelial

INTRODUÇÃO

1. Heme-oxigenase-1 (HO-1)

As heme-oxigenases (HO) são enzimas conservadas evolutivamente com a função de degradar o heme (ferro protoporfirina IX) em quantidades equimolares de ferro, monóxido de carbono (CO) e biliverdina (Tenhunem et al., 1968). O substrato da atividade das HO, o heme, existe essencialmente como grupo prostético de várias proteínas (hemeproteínas), desempenhando diversas funções tais como: transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), metabolismo de substâncias (citocromo 450), respiração mitocondrial (citocromos b e c) e sinalização celular (guanilato ciclase e Bach1) (Ponka et al, 1999; Wagner et al., 2003).

O heme livre pode catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio através da reação de Fenton, por exemplo, (Fenton, 1894 apud Gozzinelli et al, 2010), podendo causar dano celular/tissular grave. Esse potencial efeito oxidante é bem regulado por essencialmente dois mecanismos de detoxificação do heme: sistema extra-HO e HO. O sistema extra-HO retira o heme livre através da formação de um heme complexo não tóxico com proteínas de afinidade pelo heme (exemplos, hemopexina, albumina e haptoglobina), da degradação de heme (exemplos, xantina oxidase, NADPH-citocromo P-450 redutase) ou pelo sequestro de ferro livre (ferritina) (Kumar & Bandyopadhyay, 2005).

O sistema da HO realiza o catabolismo do heme através da clivagem oxidativa do anel porfirínico da molécula de heme que, em mamíferos, se dá na ponte meteno α (Fig.1). Essa clivagem dá origem à biliverdina IX α . Além da geração da molécula de biliverdina IX α , a degradação do heme pela HO gera também CO e um átomo de ferro. A reação requer três moléculas de oxigênio (O_2) e requer NADP/NADPH. A transferência de elétrons da NADPH para enzima é mediada pela citocromo P-450 redutase (Tenhunem et al, 1969).

A biliverdina IX α , em mamíferos é convertida em bilirrubina IX α pela ação enzimática da BVR (Tenhunem et al, 1970). A biliverdina não é detectada no plasma dos mamíferos, uma vez que é rapidamente convertida à bilirrubina para excreção. A

bilirrubina é removida da circulação pelos hepatócitos, onde é conjugada a duas moléculas de ácido glucurônico, glicose ou xilose para excreção (Tenhunen et al. 1969; Stocker et al., 1990; Ryter & Tyrrel, 2000).

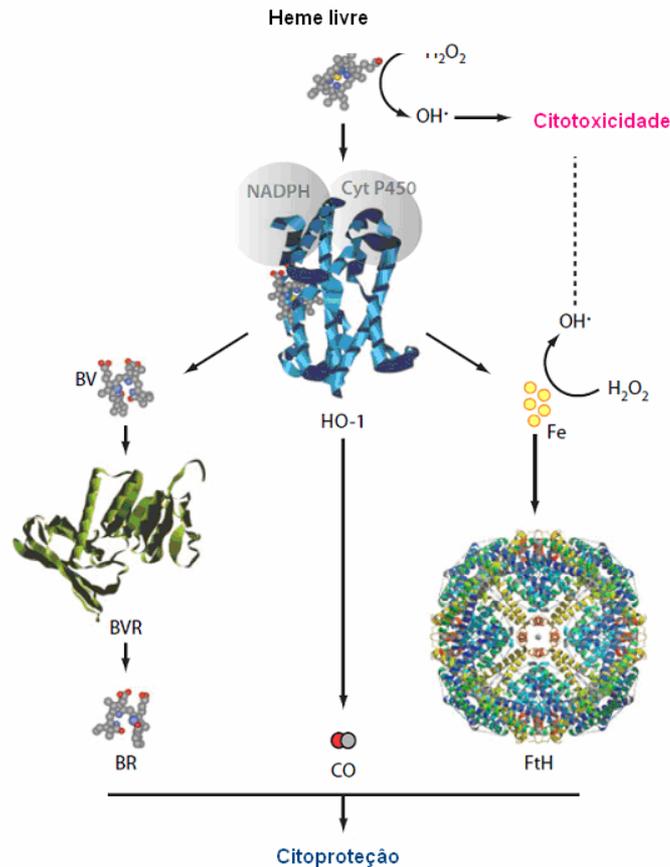


Fig. 1 – Degradação do heme pela heme-oxigenase-1 (HO-1). O heme derivado das hemeproteínas é degradado pela HO-1 em biliverdina (BV), monóxido de carbono (CO) e ferro (Fe). A biliverdina é convertida em bilirrubina (BR) pela ação da biliverdina redutase (BVR). O ferro é diretamente sequestrado pela Ferritina (FtH). Os produtos de degradação do heme possuem diversas propriedades citoprotetoras. Adaptado de Gozzelino, Jeney & Soares (2010).

A HO possui três isoformas: HO-1, HO-2 e HO-3, produtos de três genes distintos, sendo uma delas a forma induzida (HO-1) (Abraham & Kappas, 2008). A enzima HO-2 possui 36 kDa e tem expressão constitutiva. Esta enzima é encontrada em diversos tecidos, incluindo os testículos, regiões do cérebro, endotélio vascular e células musculares lisas (Abraham & Kappas, 2006). A atividade desta enzima parece

estar ligada à produção de CO que, no cérebro, atuaria como neurotransmissor. Além disso, a expressão de HO-2 parece estar relacionada com a espermatogênese e uma função óbvia seria fornecimento de ferro para a célula, uma vez que o ferro é importante neste fenômeno. A HO-2 parece também participar de geração de GMPc para contração muscular, através da geração de CO. A HO-2 é expressa nas camadas do endotélio, e de células musculares lisas dos vasos sanguíneos (Maines, 1997).

A terceira isoforma, HO-3 apresenta baixa atividade catalítica sobre o heme, sendo encontrada em vários tecidos de ratos, como baço, fígado, timo, próstata, coração, rins, testículos, e cérebro (Abraham & Kappas, 2008). Ela e a HO-2 possuem dois sítios adicionais de ligação de heme, denominados HRDs (*"Heme Regulatory Domain"*).

A HO-1 foi primeiramente purificada de homogenato de fígado de ratos injetados com CoCl₂ ou heme e de baço de suínos (Maines, Ibrahim & Kappas, 1977; Yoshida & Kikuchi, 1978; 1979). A HO-1 apresenta sua expressão aumentada em praticamente todos os tecidos animais após tratamento por heme, vários metais, fatores endócrinos e metaloporfirinas sintéticas. Vários tipos celulares em cultura respondem a esses agentes de modo similar com aumento de expressão e da atividade de HO-1 (Matsuura et al, 1995; Stout & Becker, 1986; Lutton et al, 1991; Kutty et al., 1994). A HO-1 é também considerada uma proteína de choque térmico (heat shock protein –HSP) (Shibahara et al., 1987) e uma proteína de resposta a estresse oxidativo (Keyse & Tyrrell, 1989). Devido ao aumento de expressão a diferentes estímulos físicos e químicos, a indução de HO-1 tem sido entendida como essencial em resposta a vários tipos de reação aguda e de proteção celular após injúria (Stocker et al, 1987).

1.1 Regulação de HO-1

Diversos indutores de HO-1 ativam cascatas de sinalização dependentes de fosforilação de proteínas. Tais sinalizações modulam a atividade de fatores transcricionais responsáveis pela regulação gênica de HO-1 (*Hmox1*). Numerosos estudos, utilizando inibidores químicos ou mutantes dominantes negativos, apontam o envolvimento das cascatas de sinalização de MAPKs na ativação gênica de HO-1 em

diversos tipos celulares em resposta a várias condições de indução de HO- (Chen & Maines 2000; Kacimi et al., 2000; Kiemer et al., 2003; Kietzmann, Salmoylenko & Immenschuh, 2003). Uma variedade de compostos, estrutural e funcionalmente diversa, indutora de expressão de HO-1 pode em paralelo ativar uma ou mais das 3 cascatas de sinalização da via de MAPKs em vários tipos celulares. Indutores químicos como cádmio e LPS ou em eventos de hipóxia associada com estresse por isquemia e reperfusão podem ativar todas 3 vias de sinalização de MAPKs (p38, ERK e JNK).

A transcrição gênica de *Hmox1* se dá pelo reconhecimento específico de elementos ligantes no DNA nas regiões proximal (-0,3 kb) e distal (-4 kb-E1 e -10 kb-E2) do promotor de *Hmox1*, (Alam, Cai & Smith, 1994; Alam; Camhi & Choi, 1995). A transdução de sinais e os fatores transcricionais que regulam a transcrição de *Hmox1* compartilham um denominador comum que é a ativação em resposta ao estresse oxidativo, sugerindo que a maioria senão todas as formas de estresse oxidativo são associadas com aumento rápido do catabolismo de heme intracelular, através da expressão de HO-1 (Gozzelino, Jeney & Soares, 2010).

A transcrição de *Hmox1* é regulada negativamente pelo repressor transcricional Bach1. O estresse oxidativo suprime a atividade de Bach1, o qual se mantém ligado a vários elementos de resposta a estresse (StRE-stress-responsive elements) na região promotora de *Hmox1* (Ogawa et al. 2001; Zenke-Kawasaki et al., 2007). Bach1 tem sítios de ligação ao heme, o qual induz modificações conformacionais em Bach1. Isto inibe a ligação de Bach1 com StRE, induzindo o transporte extranuclear, poliubiquitinação pela proteína ubiquitina E3 responsiva de heme ligase (heme-responsive E3 ubiquitin protein ligase-1: HOIL-1) e subsequente degradação, pela via do proteossoma 26S, de Bach1 (Zenke-Kawasaki et al., 2007). Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem também inibir a ligação de Bach1 com StREs, atingindo os grupamentos sulfidríla de Bach1 promovendo seu transporte extra nuclear e posterior degradação (Ishikawa, Numazawa & Yoshida, 2005). A liberação de Bach1 de StREs na região promotora de *Hmox1* permite o acesso do fator transcricional associado a resposta ao estresse Nrf2 (fator nuclear relacionado-2) a esses StREs e induzir a transcrição de *Hmox1* (Alam et al., 1999; Sun et al., 2002).

1.2 HO-1 na inflamação

Devido sua ampla distribuição em várias células e tecidos, muitos estudos têm descrito os inúmeros efeitos biológicos benéficos da HO-1. Tais efeitos são demonstrados através: (1) da deleção gênica ou transgenia de *Hmox1* em animais de laboratório e em culturas celulares; (2) da associação entre o polimorfismo genético de *Hmox1* e incidência ou severidade de muitas doenças humanas; (3) da indução farmacológica de HO-1 ou do emprego de metabólitos do catabolismo do heme em vários modelos experimentais de inflamação ou infecção.

Acho que aqui continua confuso, frases isoladas, soltas. Vc pode ser mais direto, talvez não citar tantos modelos, mas “costurar” mais as idéias

A deficiência genética de HO-1 (*Hmox1*^{-/-}) em camundongos está relacionada com uma maior susceptibilidade ao choque endotóxico induzido pelo LPS (Poss & Tonegawa, 1997). Camundongos *Hmox1*^{-/-} são mais susceptíveis ao modelo de isquemia/reperfusão pulmonar (Fujita et al. 2001). Camundongos transgênicos expressando HO-1 aumentada, especificamente no tecido cardíaco, apresentam uma melhor resposta na contratilidade em modelo de isquemia/reperfusão, como também proteção contra isquemia (Yet et al., 2001) A ocorrência de aumento severo no ventrículo direito após hipóxia crônica foi observada em camundongos *Hmox1*^{-/-} em comparação com camundongos selvagens (Yet et al., 1999). Em humanos, foi reportado o caso de uma criança com deficiência de HO-1 que apresentava extenso dano endotelial. Danos similares ao endotélio, bem como citotoxicidades hepática e renal, têm sido observados em camundongos *Hmox1*^{-/-}. Tanto em pacientes humanos como em camundongos, altas concentrações de heme circulante estavam presentes (Jeney et al., 2002).

O polimorfismo genético de *Hmox1* pode indicar o papel importante da HO-1 na patologia de doenças cardiovasculares e pulmonares. Yamada et al. (2000) examinando a repetição de dinucleotídeos (GT)_n na região flanqueada 5' de *Hmox1* humano, correlacionou um aumento do tamanho de (GT)_n repetidas no promotor de HMOX1 com a susceptibilidade à morbidade de enfisema pulmonar por causa da redução da indução de HO-1 por espécies reativas de oxigênio geradas pelo fumo do

cigarro. Outros estudos também correlacionam polimorfismo genético *Hmox1* com aumento de risco de desenvolvimento de doenças coronarianas arteriais, aterosclerose e maior susceptibilidade a eventos de isquemia (Chen et al, 2002; Tiroch et al, 2007).

A indução farmacológica de HO-1 ou a administração de seus produtos de degradação podem modular a resposta imune e exercer efeitos terapêuticos numa variedade de doenças inflamatórias. A expressão de HO-1 é aumentada em diversos eventos inflamatórios tais como aterosclerose e isquemia/reperfusão (Wagener et al, 2003).

A ativação endotelial por LDL oxidado e TNF é considerada um evento importante no desenvolvimento de lesões na aterosclerose. A disfunção endotelial está envolvida na formação de lesões por promover tanto inicial como tardiamente os mecanismos da aterosclerose, como aumento de secreção de quimionas, migração de leucócitos, oxidação de LDL e ativação plaquetária (Hadi et al., 2005). A expressão acentuada de HO-1 endotelial atenua de modo significativo a produção de mediadores inflamatórios e reverte o decréscimo em eNOS por TNF e LDL oxidada (Kawamura et al., 2005).

A indução de HO-1 diminui a intensidade de infarto e a incidência de arritmias por reperfusão em modelo de isquemia/reperfusão cardíaca. O dano ao tecido cardíaco é exacerbado por inibidores de HO-1 (Clark et al, 2000; Masini et al, 2003). A indução de HO-1 promove papel protetor na função renal em modelos animais de rabdomiólise, nefrotoxicidade induzida por cisplatina ou induzida por nefrite (Nath, 2007). A injúria renal por isquemia é exacerbada em camundongos *Hmox1* *-/-* com aumento de IL-6 e de disfunção renal (Tracz et al, 2007).

Os efeitos biológicos da biliverdina/bilirrubina podem ser especialmente relevantes na prevenção de morte celular por estresse oxidativo (Kushida et al., 2002). A bilirrubina, em baixas concentrações, atua como antioxidante reduzindo dano celular/tissular por estresse oxidativo (Stocker et al., 1987) e inibindo NADPH oxidase (Kwak et al., 1991) e a atividade de PKC (Sano et al., 1985). Em modelo de choque endotóxico em ratos, a administração de biliverdina diminui a injúria pulmonar e reduz significativamente a resposta inflamatória nesse órgão (Saraday-Andrews et al., 2005). A administração de biliverdina também protege o fígado de animais expostos a injúria

por isquemia/reperfusão (Fondevila et al., 2004). A biliverdina e a bilirrubina preservam a integridade de células endoteliais, previnem a morte das células endoteliais, aumentam a reatividade vascular e previnem restenosis (Sedlak & Snyder, 2004). A bilirrubina está também envolvida na redução de estresse oxidativo em diabetes experimental, em parte, por aumentar a biodisponibilidade de NO necessário para integridade das células do endotélio.

Em modelo experimental de sepse (CLP- ligação de ceco por sutura), o tratamento com biliverdina previne a supressão da contratilidade do músculo gastrointestinal induzida pela sepse *in vivo* e *in vitro*. A biliverdina reduz a infiltração de neutrófilos na musculatura do jejuno com redução de expressão dos mRNAs de IL-6 e CCL2 no mesmo modelo (Overhaus et al. 2006). O tratamento com biliverdina também protege ratos contra a injúria induzida por LPS no pulmão, inibindo a infiltração de neutrófilos. O grupo tratado com biliverdina possui menor produção de IL-6 e maior produção de IL-10 quando comparado aos animais apenas desafiados com LPS. A bilirrubina também inibe a infiltração celular no pulmão (Sarady-Andrews et al., 2005).

Recentemente foi descrito que diversas moléculas, como a citocina IL-10, tem efeitos biológicos dependentes da HO-1. Mesmo na ausência de IL-10, a expressão de HO-1 ou administração de CO ou biliverdina possuem o mesmo efeito da IL-10 em monócitos/macrófagos, como a diminuição de TNF secretado. Dados recentes demonstram também que a proteção mediada por IL-10 contra choque endotoxêmico letal é dependente de HO-1, uma vez que não ocorre tal proteção com a administração concomitante de IL-10 com o inibidor enzimático da HO-1, a ZnPPiX (Lee et al., 2007).

Outros exemplos de moléculas que dependem da HO-1 para seu funcionamento são a rapamicina no efeito anti-proliferativo em células musculares lisas, os efeitos do álcool na supressão de TNF em macrófagos, os efeitos das proteínas de choque térmico e os efeitos da molécula de VEGF, aspirina, probucol e sinvastatina. Além disso, um ou mais produtos da HO-1 conseguem reproduzir o efeito das moléculas acima citadas. A partir destes dados, Bach (2005) postulou que a HO-1 poderia ser considerada um funil terapêutico e dela dependeria a ação de diversas substâncias que convergiriam na dependência do sistema anti-inflamatório da HO-1.

1.3 Efeitos imunomoduladores da HO-1

Os efeitos imunomoduladores da HO-1 são vistos em camundongos *Hmox1*^{-/-}. A deficiência genética leva ao desenvolvimento espontâneo de uma patologia inflamatória crônica, caracterizada por leucocitose sanguínea, aumento de IgM sérico, de fagócitos tanto polimorfo como mononucleares no baço, como também em órgão não linfóides (Poss & Tonegawa, 1997a, 1997b; Otterbein et al, 2003).

Em experimentos com a linhagem murina macrofágica RAW 264.7, o CO exógeno ou o aumento da expressão de HO-1 inibe a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e MIP-1 β induzidas pelo LPS e aumenta a produção de IL-10 (Otterbein et al., 2000). Tal efeito é dependente de p38 e não de cGMP. Em neutrófilos, a indução farmacológica de HO-1 inibe a atividade da nicotinamida adenina dinucleotideo fosfatase (NADPH) oxidase, reduzindo a produção de ROS, limitando a injúria tissular por dano oxidativo em modelo de injúria intestinal por etanol (Taille et al. 2004; Li et al, 2008). Em células dendríticas, a indução farmacológica de HO-1 inibe a ativação e a apresentação antigênica tanto em células murinas, humanas como de ratos (Chaveau et al., 2005; Remy et al., 2009; Chora et al., 2007). Tal efeito é mimetizado pelos produtos de degradação da HO-1 como CO (Remy et al., 2009).

Em células da imunidade adaptativa, vários estudos sugerem os efeitos moduladores da HO-1 inibindo a ativação e proliferação de células T efetoras. A indução farmacológica de HO-1 inibe a ativação de células T CD4 auxiliares e T CD8 citotóxicas humanas (Pae et al., 2004). CO inibe a ativação de células T CD4 auxiliares (Pae et al., 2004) e induz a apoptose em células T Jurkat (Song et al., 2004). A HO-1 pode exercer seus efeitos imunoreguladores através das células T regulatórias (Treg). Células Treg murinas e humanas expressam constitutivamente HO-1 (Pae et al., 2003; Zelenay et al., 2007) e a inibição de HO-1 suprime a função das células Treg in vitro (Choi et al., 2005).

1.4 O papel da HO-1 em infecções

Embora a indução de HO-1 tenha sido associada a efeitos anti-inflamatórios, ela tem sido descrita como fundamental em diversas doenças infecciosas. No caso da infecção pelo parasita causador da malária, grandes quantidades de heme livre são geradas. Por sua vez, o heme livre parece induzir uma resposta inflamatória que causa danos ao endotélio cerebral do hospedeiro, levando ao desenvolvimento da malária cerebral (Pamplona et al., 2007). A indução da HO-1 previne o desenvolvimento da malária cerebral em camundongos, assim como o tratamento com CO. O tratamento com CO também inibiu a expressão no cérebro de citocinas pró-inflamatórias (TNF, LT- α e IFN- γ) e moléculas de adesão ICAM e VCAM e preveniu o seqüestro de células T CD8+ pelo cérebro (Pamplona et al, 2007).

A indução de HO-1 diminui a carga viral *in vitro* e *in vivo* em infecções virais como HIV (Devadas & Dhawan, 2006), hepatite B (Protzer et al., 2007) e C (Shan et al., 2007). Em modelo murino de infecção por hepatite B humana, a HO-1 (usando expressão adenoviral) protege do dano hepático mediado pelo HBV através de atividade antiviral (Protzer et al, 2007). Os fígados de pacientes infectados pelo HCV apresentam uma expressão diminuída de HO-1 restrita a hepatócitos (Abdalla et al., 2005). Hou et al. (2009) relatam que o excesso de ferro resultado do aumento de estresse oxidativo regula positivamente *Hmox1* via Nrf2, e diminui a expressão de proteínas virais do HCV em cultura de células Huh-7. Estes efeitos são revertidos pela deferoxamina (DFO), um agente quelante de ferro. Em outro estudo, utilizando biliverdina, há também um decréscimo da carga viral em cultura de células infectadas com aumento de respostas antivirais via IFN- α (Lehmann et al., 2010).

Em infecções bacterianas, a inibição de HO-1 em camundongos infectados por *Salmonella typhimurium* resulta em aumento da apoptose das células infectadas (Zaki et al., 2009). Chung et al., (2008) demonstram que a indução de HO-1, e de seu produto de catabolismo CO, são essenciais no aumento da inflamação e da atividade microbicida em modelo de CLP (ligação do ceco por sutura), modelo de sepse polimicrobiana. A administração de baixas concentrações de CO aumenta a fagocitose de *Escherichia coli* em células RAW 264.7, fato que se deve em parte ao aumento e à redistribuição de receptores do tipo toll 4 (TLR4). (Otterbein et al, 2000)

Recentemente, o requerimento de HO-1 para ativar IRF-3 é demonstrada em macrófagos *Hmox1*^{-/-} estimulados com poly I:C, *Listeria monocytogenes* e paramyxovirus (Tzima et al., 2009). Em todos esses casos, a HO-1 é necessária para produção de IFN- β .

2. A doença de Chagas

A doença de Chagas foi inicialmente descrita por Carlos Ribeiro das Chagas em 1909, tendo como agente causador o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, cujo ciclo de vida envolve vários hospedeiros vertebrados e invertebrados. Formas evolutivas distintas encontram-se implicadas no ciclo natural do parasita: duas replicativas (amastigota intracelular no hospedeiro vertebrado e epimastigota no hospedeiro invertebrado) e uma terceira não replicativa e infectiva, a forma tripomastigota sanguínea, também no vertebrado (Araújo-Jorge e Castro, 2000).

A infecção chagásica apresenta alta prevalência e alto grau de morbimortalidade tendo áreas endêmicas em países latino-americanos . Estima-se que cerca de 17 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* na América. Anualmente 2 a 3 milhões de pessoas são acometidas por complicações decorrentes da fase crônica da doença e cerca de 21 mil pessoas morrem de complicações decorrentes dessa doença (WHO, 2006).

A doença de Chagas manifesta-se nas formas aguda e crônica, cuja evolução é dependente tanto de fatores relacionados ao parasita (tropismo, virulência, cepas etc.), como de fatores relacionados ao hospedeiro, como estado nutricional, idade constituição genética e etnia (Tafari, 1987).

A fase aguda se inicia com a entrada do parasito ao invadir vários tipos celulares, como macrófagos, fibroblastos, miócitos, células endoteliais e adipócitos. Caracteriza-se por febre, linfadenopatias, hepato-esplenomegalia e miocardite aguda. Já a fase crônica inicia-se com quadro assintomático (que pode durar décadas) e 20% a 30% desses pacientes desenvolvem a fase crônica sintomática (Brenner & Gazzinelli 2000; Moncayo, 2003). Essa fase caracteriza-se por lesões no miocárdio (em cerca de

27%) dos pacientes, no sistema digestório (em 6%) e lesões no sistema nervoso (em 3% dos pacientes) (WHO, 2004).

2.1 Fase aguda

O papel da imunidade inata da infecção intracelular por *T. cruzi* pode ser detectado em pelo menos 3 formas no controle da infecção: (1) a detecção e a direta destruição de parasitas por células da imunidade inata, em particular macrófagos e células dendríticas; (2) a ativação de DC e macrófagos tornando-se potentes células apresentadoras de antígenos (APC) e ativando a resposta imune adaptativa e (3) o reconhecimento da infecção intracelular por células não hematopoiéticas que são o alvo primário da invasão pelo *T. cruzi*. As formas infectantes de *T. cruzi* podem ser reconhecidos através de receptores de reconhecimento associado a patógenos (PRR), como os receptores do tipo toll (TLR).

Macrófagos e células dendríticas deficientes das moléculas adaptadoras da via de TLR (MyD88 e TRIF) apresentam um aumento acentuado no parasitismo (Koga et al., 2006). Koga et al. (2006), associam a esse aumento de parasitismo a uma diminuição na secreção de citocinas inflamatórias como IL-12 e TNF. Múltiplos grupos têm investigado moléculas agonistas presentes em *T. cruzi* que são reconhecidos por macrófagos e DC. Campos et al. (2001) demonstraram o TLR2 como receptor de um PAMP para *T. cruzi* que são moléculas da famílias de âncoras GPI. Macrófagos estimulados com moléculas GPI secretam IL-12, NO e TNF dependentes de TLR2. (Campos et al., 2001)

TLR9 identifica DNA rico em seqüência CpG do parasito e estimula a secreção de IL-12, NO e TNF em macrófagos primados por IFN- γ . TLR9 foi também capaz de estimular uma resposta em DC e células B não primadas. A combinação de deficiência gênica de TLR2 e TLR9, em camundongos, virtualmente elimina toda indução de TNF e IL-12 em macrófagos expostos a formas tripomastigotas vivas *in vitro* (Bafica et al., 2006). Oliveira et al. (2004) identificaram que a ceramida glicoinositolfolípídica (GIPL) pode ativar *in vivo* e *in vitro* resposta dependente de TLR4 em camundongos. Outra

molécula identificada é a cruzipaina, que desencadeia ativação de DC, via ativação de cininas endógenas (Monteiro et al., 2006).

Recentemente, Silva et al. (2009) demonstraram que o domínio de oligomerização ligador de nucleotídeos (Nod) pode desempenhar papel como PRR no reconhecimento e ativação numa resposta contra *T. cruzi*. Camundongos deficientes geneticamente de Nod1 apresentam parasitemia tão aumentada quanto a de camundongos MyD88 *-/-* e NOS2 *-/-*. *In vitro*, macrófagos Nod1*-/-* tiveram menores secreções de NO, IL-12 e TNF dependentes de NF- κ B, mesmo na presença de IFN- γ .

Tipicamente, macrófagos secretam citocinas IL-12 e IFN- α/β , ativando células NK a produzirem IFN- γ (Aliberti et al, 1996; Une et al., 2003). Esta citocina age reciprocamente sobre macrófagos, ativando-os e aumentando assim sua atividade microbicida. A citocina TNF- α produzida por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi*, participa dessa interação aumentando a atividade microbicida de forma sinérgica tanto com IL-12 como com IFN- γ (Oswald et al, 1992). O papel protetor do IFN- γ no início da infecção é bem evidenciado em estudos utilizando camundongos deficientes do receptor de IFN- γ que são muito susceptíveis à infecção (Rottenberg et al., 1996).

O papel de TNF na resposta inata é complexo, levando tanto a efeitos deletérios como protetores. Macrófagos de animais susceptíveis secretam níveis mais altos de TNF comparados a macrófagos de animais resistentes (Russo et al., 1989). A injeção de TNF exacerba a mortalidade de animais infectados apesar de induzir um aumento na atividade microbicida *in vitro* (Black et al., 1989). O papel protetor de TNF é mostrado em animais geneticamente deficientes do receptor de TNF que apresentam uma maior parasitemia e mortalidade quando infectados com *T. cruzi* (Santos Lima, et al, 1997). Em associação ao TNF, IFN do tipo I e IFN- γ , produzido por células NK, ativam a expressão de iNOS (óxido nítrico sintetase induzida) em macrófagos e a produção de NO com atividade tóxica sobre *T. cruzi* (Muñoz et al., 1992; Costa et al, 2006).

No entanto, há várias evidências de que a resposta imune inata ao *T. cruzi* se auto-regula, reduzindo a ativação de macrófagos e a produção de NO local. As citocinas IL-10 e TGF- β inibem *in vitro* a produção de NO e atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por IFN- γ . (Silva, Twardzik & Reed, 1991; Silva et al. 1992)

Diferentes estudos demonstram a associação entre a maior susceptibilidade de linhagens murinas à infecção e uma maior produção de IL-10. Camundongos IL-10^{-/-} são capazes de controlar melhor a infecção por *T. cruzi* (Hunter et al., 1997), no entanto, a necessidade de produzir IL-10 pode estar relacionada com a proteção do hospedeiro contra sua própria resposta imune. Hunter et al. (1997) utilizando a cepa Tulahen de *T. cruzi*, confirmaram que animais controlam melhor a parasitemia e carga parasitária no tecido cardíaco, mas nesse modelo, os animais deficientes de IL-10^{-/-} tem morte precoce pelo excesso de produção IL-12, TNF e IFN- γ . Um modelo diferente utilizando a cepa Brazil de *T. cruzi*, no entanto, observou uma maior produção de IL-10 em animais resistentes, quando comparados aos susceptíveis (Zhang & Tarleton, 1996). Além de IL-10, TGF- β poderia também regular a replicação do parasita em células infectadas (Silva et al., 1991). Um estudo *in vitro* com linhagens de células epiteliais e musculares sugere que a via de sinalização celular de TGF- β e seus receptores é necessária para que ocorra a invasão da célula pelo *T. cruzi* (Ming et al., 1995).

Além da ativação de macrófagos e células NK, a infecção pelo *T. cruzi* também mobiliza precocemente outros elementos celulares da imunidade inata. Subpopulações de linfócitos são intensamente estimuladas durante o curso da infecção como as células B CD5⁺ e células T $\gamma\delta$ ⁺ (Hunter et al, 1997; Minoprio et al., 1989). Embora essas subpopulações reorganizem somaticamente os genes de seu receptores antigênicos (TCR e BCR), apresentam repertório de especificidade restrita, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Camundongos Xid, (deficientes geneticamente em células B CD5⁺) apresentam resistência aumentada ao *T.cruzi*, tendo menor ativação policlonal de linfócitos B e T e grau de lesão inflamatória no tecido muscular (Minoprio et al, 1993). Linfócitos T $\gamma\delta$ ⁺ podem ser ativados por antígenos contendo prenil-pirofosfato (componente de membrana de microorganismos envolvidos na ligação de carboidratos) e dispensam processamento antigênico ou de associação com produtos MHC. Esses tipos de linfócito secretam IFN- γ e TNF e induzem diferenciação de células Th1. Seu número aumenta muito durante o curso da infecção por *T. cruzi* (Minoprio et al., 1989) e podem modular a parasitemia e a inflamação característica da miocardite aguda (Santos-Lima & Minoprio, 1996).

Outros componentes da imunidade inata, como o sistema complemento, também são ativados, entretanto, as formas tripomastigotas são resistentes à lise direta induzida por proteínas do sistema complemento, o que não ocorre com as formas epimastigotas. Esse fenômeno parece estar relacionado à presença de proteínas na superfície de tripomastigotas capazes de desestabilizar a estrutura C3 convertase depositada na membrana do parasito (Tambourgi et al., 1993).

A resposta imune inata tem um papel inicial importante na defesa contra *T. cruzi*, controlando parcialmente a infecção. Animais geneticamente deficientes de RAG, enzima responsável pelo rearranjo gênico em linfócitos (RAG -/-), controlam tão bem como os animais normais a infecção durante a primeira semana, perdendo a seguir o controle da parasitemia, enquanto animais normais conseguem resolvê-la (Abrahamshon & Coffman, 1996; Tarleton 1990; Tarleton et al., 1992; Rottemberg et al., 1993). A necessidade de células T CD4 na defesa poderia estar relacionada com ativação imunológica de macrófagos infectados por células do tipo Th1, produtoras de IFN- γ e com conseqüente destruição intracelular de parasitas e no caso de células Th2, com a indução da produção de anticorpos líticos protetores (Zhang; Tarleton, 1996). A necessidade de células T CD8 na defesa está associada com a capacidade citotóxica, uma vez que o parasita é capaz de infectar qualquer tipo celular do hospedeiro (Martin; Talerton, 2004).

2.2 Fase crônica

A fase crônica da doença de Chagas caracteriza-se frequentemente por insuficiência cardíaca e distúrbios digestivos decorrentes principalmente de megacólon e megaesôfago. Diferentemente da fase aguda, não há um grande parasitismo tissular, e os poucos parasitas encontrados não guardam relação direta com os danos teciduais observados em extensão e localização. Entretanto nos últimos anos tem-se demonstrado que a persistência parasitária apresenta importância na determinação da lesão cardíaca crônica. Higushi et al. (2003) demonstraram uma correlação positiva entre a presença de antígenos de *T. cruzi* e o aumento de células T CD8 no coração de pacientes chagásicos crônicos.

Na fase crônica humana, o perfil de citocinas continua sendo predominante do tipo th1 e com supressão de Th2, e com níveis plasmáticos altos de TNF- α (Ribeirão et al., 2000; Abel et al., 2001). Células T CD4 sanguíneas de pacientes chagásicos cardiomiopatas produzem mais IFN- γ e menos IL-10 que pacientes assintomáticos (Abel et al., 2001; Gomes et al, 2003), o que suporta a ideia de que pacientes chagásicos cardiomiopatas desenvolvem uma resposta imune do tipo Th1 exarcebada. O TNF plasmático está aumentado em pacientes chagásicos que desenvolvem uma cardiomiopatia mais severa (Cunha-Neto et al., 2006; Ferreira et al., 2003). Polimorfismo genético do TNF associado com aumento de secreção dessa citocina tem sido correlacionado com pacientes chagásicos com cardiomiopatias mais severas (Drigo et al, 2008). Polimorfismo entre outros genes de citocinas inflamatórias (linfotóxina- α e CCL2) têm sido também identificados como agravadores no desenvolvimento de cardiomiopatia associada à doença de Chagas (Ramasawmy et al.,2008).

O infiltrado inflamatório no coração de um paciente na fase crônica inclui macrófagos, linfócitos T CD8 expressando granzimas, e linfócitos T CD4 (Cunha-Neto et al., 2006). Há também aumento local da expressão de moléculas de adesão, quimiocinas (como CCL2), IL-10, receptores de quimiocinas (como CCR2 e CXCR3) e as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6. Sinalização aumentada por IFN- γ é observada no miocárdio de pacientes chagásicos cardiomiopatas, e IFN- γ e CCL2 aumentam a expressão do fator natriurético atrial, o qual é considerado um marcador do hipertrofiamento de cardiomiócitos em cardiomiócitos murinos neonatos (Cunha-Neto et al., 2005).

Experimentalmente, camundongos infectados com *T. cruzi* produzem anticorpos reativos a vários antígenos endógenos encontrados no coração, nos nervos e outros tecidos (Cunha-Neto et al., 2004). A autoimunidade celular contra antígenos cardíacos é observada em modelos animais. A transferência passiva de células T CD4 ou células T de camundongos infectados na fase crônica para camundongos não infectados singênicos causa inflamação no tecido cardíaco (Ribeiro-dos-Santos et al., 2001). A imunização de camundongos com a proteína cruzipaina de *T. cruzi* induz a geração de anticorpos reativos à miosina de músculo esquelético e cardíaco e contra o receptor

muscarínico cardíaco, levando ao dano tissular muscular e às alterações na fisiologia cardíaca (Giordanengo et al., 2000).

Para atingirem essa condição de persistência no hospedeiro, as formas infectantes do *T. cruzi* podem produzir moléculas que modulam a resposta imune em diferentes níveis e momentos da infecção como na ativação policlonal linfocitária e na imunossupressão na doença de Chagas, impedindo a eliminação completa do parasita. Lauria-Pires & Teixeira (1996) mostraram a existência de nítida variabilidade na capacidade de induzir parasitemia e lesões cardíacas em camundongos, entre clones de *T. cruzi*, isolados de pacientes chagásicos. Extratos parasitários ou antígenos recombinantes de *T. cruzi* induzem uma intensa resposta proliferativa de linfócitos T humanos (van Voorhis, 1992). Um fator supressor produzido pelo *T. cruzi* (cepa Tulauhen) e denominado de TIF (trypomastigote immunosuppressive factor) provoca múltiplos efeitos inibitórios sobre a ativação de linfócitos T como inibição da síntese de citocinas, como IL-2 e IFN- γ e do receptor de IL-2 (Beltz et al., 1988).

O envolvimento do estresse oxidativo na geração de lesões cardíacas em pacientes chagásicos é relatado por diversos estudos. Análises de microscopia eletrônica de biópsia de corações de paciente chagásicos e de animais experimentais mostram que, com o desenvolvimento da doença, ocorrem mudanças degenerativas mitocondriais no tecido cardíaco (Carrasco-Guerra et al., 1987; Palacios-Pru et al., 1989; Parada et al, 1997). Uyemura et al. (1996) mostram que a disfunção mitocondrial em coração de camundongos infectados está associada com o declínio das atividades respiratórias dos complexos da NADH-ubiquinona redutase, e ubiquinol-citocromo c redutase e da ATP sintase. O miocárdio contém grande quantidade de compostos antioxidantes (como GSH) e enzimas antioxidantes que protegem cardiomiócitos da injúria de estresse oxidativo (Dhala et al., 2000; Marczin et al., 2003). Porém níveis de GSH e MnSOD estão significativamente diminuídos em camundongos chagásicos (Wen & Garg, 2004). Um relativo declínio nos níveis plasmáticos de GSH e do decréscimo de MnSOD também é encontrado em pacientes chagásicos (Wen et al., 2006; Oliveira, Pedrosa & Filho, 2007).

A persistente ativação de estresse oxidativo com conseqüente injúria pode ter relevância no dano tissular cardíaco observado na doença de Chagas. Isso pode estar

associado ao fato de que cerca de 10% de pacientes chagásicos crônicos exibem sinais de isquemia (Oliveira, 1985; Marin-Neto et al., 1995). A isquemia ocasiona hipóxia ao tecido. A hipóxia, devido a baixa disponibilidade de oxigênio, leva à disfunção da respiração mitocondrial com a produção aumentada de ROS em função da reperfusão (Lesnefsky et al., 2001).

3. Hipótese

A indução de HO-1 diminui a carga viral *in vitro* e *in vivo* em infecções como HIV (Devadas & Dhawan, 2006), hepatite B (Protzer et al., 2007) e C (Shan et al., 2007). Essa tendência geral à redução da carga de infecções decorrente da indução de HO-1 foi apontada por Chung et al. (2009), mas nenhum mecanismo pode ser atribuído às propriedades anti-virais da indução da HO-1. A inibição de HO-1 em camundongos resultou ainda em crescimento aumentado de *Salmonella typhimurium* (Zaki et al., 2009), apontando para um efeito protetor geral da HO-1 contra patógenos intracelulares. Recentemente, o requerimento de HO-1 para ativar IRF3 foi demonstrado em macrófagos estimulados com poly I:C, *Listeria* e paramyxovirus (Tzima e tal., 2009) Em todos os casos, HO-1 foi necessária para a produção de IFN β . Ainda, a ausência de HO-1 e da produção de IFN β aumentaram a severidade da encefalomielite alérgica experimental (EAE), aumentando o número de células Th17. Esses resultados inesperados oferecem um novo paradigma para entender a proteção induzida por HO-1 durante infecções intracelulares e nos estimularam a investigar os efeitos da indução de HO-1 na infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Hipotetizamos que a HO-1 aumenta a resistência em modelo murino de infecção por *T. cruzi* por suas propriedades imunoreguladoras e por diminuir o estresse oxidativo visto na infecção por *T. cruzi*.

OBJETIVO GERAL

- 1 Avaliar o papel da heme-oxigenase-1 em modelo murino de infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2 Avaliar os efeitos do tratamento de CoPP (indutor de HO-1 e SnPP(inibidor enzimático) na parasitemia, no parasitismo tissular de camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi*.
- 3 Avaliar os efeitos do tratamento de CoPP e SnPP na carga parasitária de fagócitos mononucleares (murinos ou humanos) infectados por *T. cruzi in vitro* e *ex vivo*.
- 4 Avaliar o efeito tóxico direto da CoPP e SnPP em formas tripomastigotas de *T. cruzi in vitro*.
- 5 Estudar o envolvimento de mediadores inflamatórios (TNF, NO e IFN do tipo I) no tratamento de CoPP *in vitro* e *in vivo*.
- 6 Verificar o envolvimento do estresse oxidativo no tratamento de CoPP e SnPP na infecção por *T. cruzi in vitro*.
- 7 Verificar o efeito do tratamento de CoPP e SnPP na apoptose de linfócitos T no baço de animais infectados por *T. cruzi*.
- 8 Avaliar o efeito do tratamento de CoPP na modulação da resposta imune através da quantificação de citocinas de esplenócitos (IL-4, IFN- γ , IL-17 e IL-10) *ex vivo* de camundongos infectados, e da participação de linfócitos T CD8 *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Reagentes

O heme (ferro protoporfirina IX), estanho protoporfirina IX (SnPP) e cobalto protoporfirina IX (CoPP), bilverdina (Bvd) e bilirrubina (Brb) foram obtidos comercialmente da Frontier Science. N-acetilcisteína (NAC) foi obtida comercialmente da Sigma. Paraquat (Sigma) foi cedido gentilmente pelo Prof. Marcus Oliveira, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. O meio RPMI 1640 e DMEM foram provenientes da LGC Biotecnologia. O soro fetal bovino foi obtido comercialmente da Invitrogen. O sulfato ferroso foi proveniente da Merck. A droga 2-aminopurina (2-AP) foi gentilmente cedido pelo Prof. Ulisses Lopes, Instituto de Biofísica, UFRJ. LPS 0111:B4 de *Escheria coli* foi obtido da InvivoGen.

2. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos das linhagens C57Bl/6 e sv129 com idade de 6 a 8 semanas. Todos os animais selvagens foram provenientes do biotério central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ou do biotério do departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG) da UFRJ. Camundongos geneticamente deficientes de CD8 (CD8 -/-), perforina (PKO -/-) e IFN- γ (IFN- γ -/-) de histórico genético em C57Bl/6, foram obtidos do biotério central da FIOCRUZ através de colaboração com a Dra. Joseli Lannes, Laboratório Biologia das Interações, FIOCRUZ. Camundongos geneticamente deficientes do receptor para IFN I (IFNAR -/-), de histórico genético em sv129, foram gentilmente cedidos pela Prof. Isis Abrahamnson, Universidade de São Paulo (USP). Camundongos gp91 phox -/-, histórico genético em C57Bl/6, foram gentilmente cedidos pela Prof. Leda Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os animais foram mantidos em temperatura constante (25 °C) e com ciclos de 12 h de luz/escuridão. O cuidado e o manuseio dos animais estavam de acordo com as normas do Comitê de Ética da UFRJ.

3. Preparação de reagentes

O tioglicolato foi diluído em PBS e após a autoclavação armazenado ao abrigo da luz. O NAC foi diluído em meio RPMI 1640 e seu pH ajustado com NaOH 5M para 7,4 e esterilizado por filtração antes do uso. A solução estoque de apocinina foi preparada em DMSO (dimetil-sulfóxido) a uma concentração de 10 mM. O paraquat e a deferoxamina foram diluídas em água apirogênica, esterilizadas por filtração e usadas imediatamente.

Nos experimentos *in vitro*, as soluções-estoque das porfirinas (CoPP- 3,3 mg, Heme – 3,3 mg SnPP – 3,8 mg, Bvd – 3,1 mg e Brb – 2,8 mg) foram preparadas em 200 µL NaOH 0,1 N e agitadas vigorosamente por 20 min e posteriormente diluídas em RPMI 1640 a uma concentração final de 5 mM. Essas soluções-estoque foram diluídas em RPMI com 10% de soro fetal bovino a 100 µM (CoPP, Bvd e SnPP) ou 20 µM (Brb) e previamente filtradas (poro 0,22 µM) imediatamente antes do uso.

Em experimentos *in vivo*, as soluções-estoque das metaloporfirinas (CoPP – 3,3 mg e SnPP – 3,8 mg) foram preparadas em 200 µL NaOH 0,1 M, agitadas vigorosamente por 20 min e diluídas em PBS a uma concentração final de 1 mg/mL (pH ajustado para 7.4) e mantidas em alíquotas a -80 °C.

4. Infecção experimental

Para experimentos *in vivo*, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p) com 10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, gentilmente cedida pela pesquisadora Dra. Nazareth Soeiro da FIOCRUZ. Os animais foram tratados com CoPP (5 mg/Kg), SnPP (5 mg/Kg), ou veículo (-) via i.p. 24h antes da infecção e a partir daí, diariamente. A contagem de parasitas no sangue foi feita ao longo de 15 dias pós-infecção pelo método Pizzi-Brenner. (Araújo-Jorge & Castro, 2000). A letalidade dos camundongos infectados foi acompanhada por até 25 dias após inoculação.

As doses do tratamento de CoPP e SnPP tanto *in vivo* quanto *in vitro* foram padronizadas previamente. *In vivo*, camundongos C57BL/6 não infectados foram

injetados durante 30 dias consecutivos sem aparente sinais de toxicidade (pêlos eriçados e perda de peso) e letalidade ao longo do tratamento. Para experimentos *in vitro*, macrófagos não infectados foram incubados por até 48 h com as porfirinas (CoPP, SnPP, Bvd e Brb) e não apresentaram perda de viabilidade significativa nas concentrações utilizadas na presente tese.

Para experimentos *in vitro*, formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas a partir da cultura de células infectadas da linhagem LLCMK2.

5. Análise histológica de tecidos de camundongos infectados

Os tecidos do fígado, quadríceps femural, coração foram coletados após 14 dias da inoculação de *T. cruzi* em camundongos C57Bl/6. Os tecidos retirados para análise histológica foram preservados em formol tamponado a 10% para posterior análise histológica. A técnica histológica para coloração foi de hematoxilina e eosina para contagem de ninhos de amastigotas nos tecidos infectados.

6. Isolamento de macrófagos peritoneais e diferenciação de cultura de células THP-1

Os camundongos selvagens e geneticamente deficientes foram injetados intraperitonealmente com 2 mL de uma solução de Tioglicolato a 3% em PBS. Após 3-5 dias, as células do exsudato peritoneal foram obtidas por lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de RPMI-1640 gelado. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em quantidades variadas em placas de culturas conforme necessidade dos experimentos que foram conduzidos (quantificação de TNF, NO e carga parasitária). As células da linhagem THP-1 foram induzidas a uma diferenciação tornando-se aderentes com PMA (20 ng/mL) em DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino por um período de 48 h. Após esse tempo, os poços foram lavados 2x com DMEM para retirada de células não aderentes. As células THP-1 aderentes foram então cultivadas com DMEM contendo 10 % de soro fetal bovino e mantidas por 16-24 h para posterior infecção com formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

7. Transfecção de células THP-1

A transfecção de células THP-1 foi feita utilizando o reagente lipofectamina 2000, de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen), com adaptações. Resumidamente, para cada poço, preparou-se um tubo com 1 µg de DNA plasmidial pcDNA™3.1(+) (contendo ou não o gene *Hmox1*) em volume final de 50 µL de meio DMEM (LGC), e um tubo contendo 0,5 µL de lipofectamina em volume final de 50 µL. As duas preparações ficaram a 25° C por 5 minutos. Depois, juntou-se os tubos e homogeneizou, deixando em temperatura ambiente por 20 min. Decorrido isso, Retirou-se o meio de cultura das células com cuidado para não removê-las e adicionou-se os 100 µL com cuidado. A cultura foi mantida a 37°C, 5% CO₂ por 4 horas. Depois, adicionou-se 400 µL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino às células transfectadas e cultivadas por aproximadamente 24 h, para posterior infecção com formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

8. Dosagem de TNF e NO *in vitro*

Para experimentos *in vitro*, aproximadamente 2×10^5 células peritoneais elicítadas com tioglicolato foram plaqueadas por poço em placas de cultura com 96 poços e mantidas durante 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ em RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino. Após esse tempo, as células foram lavadas duas vezes com 0,2 mL de RPMI-1640 a 37°C para remover as células não aderentes. Os macrófagos foram então cultivados em 0,2 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino termo-inativado e cultivados por 16-24 h. No dia seguinte as células foram infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* (proporção 3:1, parasita: macrófago) por 12h e posteriormente tratadas ou não com determinadas drogas (os tratamentos estão descritos nas legendas das figuras na seção resultados), por 24 h (para dosagem de TNF) e 48 h (para dosagem de NO) e o sobrenadante foi coletado para quantificação de TNF-α, por ELISA sanduíche e NO pelo método de Griess.

9. Quantificação da carga parasitária *in vitro* e *ex vivo*

Para avaliar a carga parasitária *in vitro*, 3×10^5 células peritoneais elicítadas com tioglicolato foram plaqueadas em lamínulas circulares em placa de 24 poços infectados em RPMI-1640. Após 1 h, os poços foram lavados duas vezes com RPMI-1640 para remoção de células não aderentes. As células aderentes (macrófagos em sua grande maioria) foram mantidas em meio RPMI-1640, contendo 10% de soro fetal bovino por 16h-24h. No dia seguinte, os macrófagos foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (proporção 3:1, parasita: macrófago) por 12 h. Após incubação com os parasitas, as culturas foram lavadas com RPMI-1640 para remoção de tripomastigotas não internalizados e estimuladas com as determinadas drogas (as concentrações das drogas estão descritas nas legendas das figuras na seção resultados). Em células THP-1 aderentes (transfectadas ou não), foram plaqueadas cerca de 3×10^5 células/poço em placas de 24 poços e infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* (proporção 3:1, parasita: célula) por 12 h. As culturas então foram lavadas com DMEM para remoção de tripomastigotas não internalizados e estimuladas com as determinadas drogas (as concentrações das drogas estão descritas nas legendas das figuras na seção resultados). As preparações foram fixadas em metanol e coradas com o corante Giemsa. Para determinação do parasitismo, 200-300 células foram contadas para quantificação de amastigotas intracelulares por célula infectada.

Em experimentos *ex vivo*, , as células peritoneais de camundongos C57B/6 infectados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* tratados ou não com SnPP e CoPP foram obtidas 9 dias pós-infecção para quantificação da carga parasitária. 4×10^5 células peritoneais foram plaqueadas em lamínulas circulares em placas de 24 poços em RPMI-1640 por 1h. Após esse período as células não aderentes foram lavadas 2x com RPMI-1640 e deixadas por 48h em RPMI-1640. As preparações foram fixadas em metanol e coradas com o corante Giemsa. Para determinação do parasitismo, 200-300 células foram contadas para percentagem de células infectadas e para quantificação de amastigotas intracelulares por célula infectada.

10. Quantificação da expressão gênica de *ifnb*

Macrófagos peritoneais elicitados com tioglicolato (3×10^6 células/poço em placa de 6 poços) foram infectados por 12h com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (proporção 3:1, parasita: macrófago). Após incubação com os parasitas, as culturas foram lavadas com RPMI-1640 para remoção de tripomastigotas não internalizados e estimuladas com as determinadas drogas (as concentrações das drogas estão descritas nas legendas das figuras na seção resultados) nos tempos de 0 h, 6h, 10h, 12 h e 36 h pós-infecção. As células foram lisadas com Trizol (Invitrogen) para obtenção de RNA total, a extração do RNA foi feita conforme recomendação do fabricante do Trizol. Após extração de RNA, 1 µg de RNA total foi usado para gerar 10 µL de cDNA usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e random primers (Invitrogen).

A reação de PCR em tempo real foi feita conforme protocolo do fabricante (SYBR Green da Applied Biosystems). Resumidamente, 10 µL do master mix foram misturados aos primers forward e reverse na concentração de 300nM e a 2 µL de cDNA diluído 10X. O volume foi corrigido para 20 µL de volume final com água MiliQ autoclavada. Cada amostra foi analisada em triplicata no PCR em tempo real. A reações foram realizadas em aparelho ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (SDS) do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. O produto de amplificação foi feito com ciclos 95°C por 15 s e 60°C por 60 s. O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi usado para determinar a expressão relativa de *ifnb* (Livak & Shmittgen, 2001). A critério de comparação, cada amostra foi normalizada a partir da expressão do seu respectivo *hpri* e expressas como expressão relativa, em relação ao controle de células não infectadas, que foi arbitrariamente considerado igual a 1. Os primers forward e reverse seguem descritos abaixo:

| | |
|-----------------|------------------------|
| IFN-β murino F | TCCAAGAAAGGACGAACATTGG |
| IFN- β murino R | TGAGGACATCTCCCACGTCAA |
| HPRT murino F | GCTGGTGAAAAGGACCTCT |
| HPRT murino R | CACAGGACTAGAACACCTGC |

11. Viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Para avaliar a toxicidade das metaloporfirinas, CoPP e SnPP foram incubadas a uma concentração de 50 μM em RPMI-1640 contendo 10 % de soro fetal bovino em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (obtidas *in vitro* de garrafas de cultura infectadas de LLCKM2) por até 48h. A viabilidade foi quantificada através da motilidade das formas tripomastigotas.

12. Análise da expressão de HO-1 e IRF3 por Western blot

Para avaliar a expressão de HO-1 e de IRF3 fosforilado $2.5-5 \times 10^6$ macrófagos peritoneais elicitados com tioglicolato foram plaqueados em placa de 6 poços. Os macrófagos foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (proporção 3:1, parasita: macrófago) por 12h e posteriormente tratadas ou não com determinadas drogas (os tratamentos estão descritos nas legendas das figuras na seção resultados), por 24 h (para análise de HO-1) ou por 9 h e 10 h (para análise de IRF3 fosforilado). Depois do período de incubação os sobrenadantes foram descartados e as células então lisadas em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, Deoxicolato de sódio 0.25% e EDTA 1 mM) contendo PMSF (1 mM), ortovanadato de sódio (1 mM) e NaF (1 mM). Os extratos celulares foram centrifugados, a concentração protéica de cada amostra foi mensurada usando kit de dosagem de proteína (Bio-Rad), os sobrenadantes fervidos e 20 μg das proteínas foram separadas em SDS-PAGE 10% em condições redutoras. Depois de finalizada a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose a 4°C durante 2 horas com uma corrente de 200 mA. As membranas foram bloqueadas por 1 h com solução de Tris com 0.05 % de Tween 20 (TBS-T), pH 7,4 e 5 % de PBS-BSA 1%. As membranas foram incubadas por 16 h com anti-HO-1(Santa Cruz Biotechnology) ou anti-IRF3 fosforilado (Cell signalling) diluído 1/1000 em tampão de bloqueio. Posteriormente as membranas foram lavadas e incubadas com o conjugado anti-rabbit-HRP (Santa Cruz Biotechnology) (1/10000) e revelado com ECL (Santa Cruz Biotechnology). O controle de carregamento foi feito incubando por 16 h a membrana com anti β -actin (Santa Cruz

Biotechnology) (1/1000) após o tratamento das membranas com tampão 100 mM de β -Mercaptoetanol, 2 % de SDS e 62.5 mM de Tris-HCl, pH 6.7 durante 30 minutos a 50°C, para retirar os anticorpos anteriormente ligados.

13. Reestímulo *ex vivo* de células peritoneais e esplenócitos

9 dias pós-infecção, as células peritoneais e esplenócitos de camundongos C57B/6 infectados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* tratados ou não com SnPP e CoPP foram obtidas para reestimulação *ex vivo*. 2×10^5 células peritoneais foram plaqueadas em placa de 96 poços e reestimuladas ou não com LPS (100 ng/mL) por 24h (para quantificação de TNF) e 48h para quantificação de NO. Os esplenócitos foram plaqueados em placas de 96 orifícios de fundo redondo numa concentração de 5×10^6 esplenócitos/ mL e reestimulados ou não com anticorpo anti-CD3 (α CD3) por 48h para quantificação de IL-17, IFN- γ e IL-10 e IL-4.

14. Quantificação de óxido nítrico

A dosagem de NO foi mensurada indiretamente através da quantificação da concentração de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos pela metodologia de Griess. Resumidamente, soluções A (sulfanilamida 1%) e B (naftiletildiamina dihidroclorídrico 0,1%), ambas diluídas em ácido fosfórico 2,5%, foram adicionadas em igual quantidade (50 μ L) em poços de placa 96, juntamente com 100 μ L do sobrenadante da cultura de macrófagos analisadas. A Incubou-se a reação à temperatura ambiente por 10 min para posterior quantificação colorimétrica em espectrofotômetro a 570 nm. , A curva padrão foi feita usando nitrito de sódio com pontos variando serialmente de 0 a 100 μ M em 8 pontos.

15. Quantificação de citocinas por ELISA

As citocinas foram quantificadas no sobrenadante de culturas *in vitro* de macrófagos elicitados com tioglicolato infectados, de culturas *ex vivo* de células peritoneais aderentes (reestimuladas ou não com LPS) e de esplenócitos (reestimulados ou não com α CD3) de animais infectados 9 dpi pela técnica de ELISA sanduíche. IL-17 e IFN- γ foram quantificadas pelo kit duoset do fabricante R&D e TNF- α e IL-10 pelo kit duoset do fabricante Peprotech. Resumidamente, placas de 96 poços foram cobertas com anticorpo específico para cada citocina que foi quantificada. No dia seguinte, incubou-se os poços com PBS 1% BSA por 1 hora com o intuito de bloquear as superfícies da placa que não foram cobertas com o anticorpo (anticorpo primário) e assim minimizar as interações não específicas (placa e proteína). Após esta etapa, aplicou-se as amostras a serem avaliadas na placa e 7 concentrações conhecidas da citocina recombinante que foi incubada por 2 horas. Então incubou-se os poços utilizados com um outro anticorpo específico (anticorpo secundário) para a determinada amostra, este anticorpo está conjugado a uma molécula de biotina. Após 1 hora adicionou-se a enzima peroxidase conjugada a avidina que irá interagir com a biotina no anticorpo secundário, esta incubação se deu por 30 minutos. A revelação do ELISA deu-se incubando o substrato da peroxidase nas amostras e a reação de coloração e parado com ácido clorídrico 1 M. A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro em 490 nm.

16. Perfil de apoptose e de linfócitos T em camundongos infectados

Esplenócitos (10^6 células), obtidos de camundongos infectados 9 dpi tratados ou não com CoPP ou SnPP foram ressuspensos em tampão de FACS (PBS-BSA 1%, 0,01% azida sódica). Os receptores celulares Fc foram bloqueados com incubação a 4^o C com anticorpos anti-CD16/CD32 (Pharmigen-BD Bioscience) por 15 min. Após isso, para identificação de linfócitos T, os esplenócitos foram incubados com anticorpo anti-CD4-PE (Pharmigen-BD Bioscience) ou anti-CD8-Cy5 (Pharmigen-BD Bioscience) e anti-CD69-PE (Pharmigen-BD Bioscience) a 4^o C por 30 min. Após isso, foram lavados

e centrifugados duas vezes com tampão de FACS. Para avaliar apoptose, os esplenócitos foram incubados com anexina V-FITC por 10 min a temperatura ambiente (25° C). Os esplenócitos foram lavados e centrifugados 2 vezes com tampão de anexina V e foi adicionado iodeto de propídio (20 µg/mL). Todas as amostras foram analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (departamento de Imunologia, IMPPG, UFRJ, através do software *Cell Quest*.)

17. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita no programa *GraphPad Prism 5*, utilizando o teste t de Student. Os dados foram representados como média± EPM. A análise estatística para avaliar a curva de sobrevivência de animais infectados foi feita também no programa *GraphPad Prism 5*, utilizando o teste Gehan-Breslow-Wilcoxon.

RESULTADOS

1. A CoPP aumenta a expressão de HO-1 em macrófagos infectados

Para padronizar nosso modelo de estudo, inicialmente, fomos confirmar o efeito das metaloporfirinas CoPP e SnPP na expressão da HO-1 em macrófagos. Macrófagos, obtidos de camundongos C57BL/6, foram infectados ou não, na presença ou ausência de CoPP ou SnPP. Após 24h de tratamento, a expressão de HO-1 foi analisada por immunoblot. Como pode ser observado na fig 2, o tratamento com CoPP aumentou a expressão de HO-1 tanto em macrófagos não infectados como em infectados, em relação a macrófagos sem tratamento (Fig. 2). A SnPP, um inibidor da ação enzimática da HO-1, produziu um aumento menos expressivo da expressão de HO-1 em macrófagos infectados. Comentar esse aumento de HO1 por SnPP

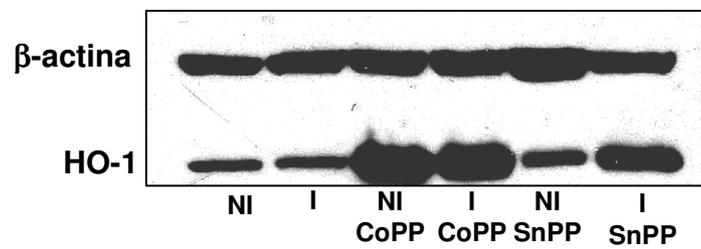


Figura 2 – CoPP aumenta a expressão de HO-1 em macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 infectados ou não foram tratados com CoPP (50 μ M) e SnPP (50 μ M) por 24 h. A expressão de HO-1 foi avaliada por imunoblot, usando anticorpo anti-HO-1.

2. A CoPP reduz a parasitemia e o parasitismo tissular em camundongos C57BL/6

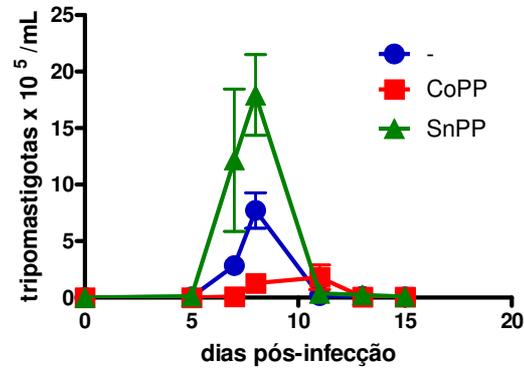
A heme-oxigenase-1 é expressa em condições de estresse oxidativo e também em infecções por patógenos intracelulares. Inicialmente, avaliamos o efeito da modulação da HO-1 com emprego de metaloporfirinas, (indutor da expressão – CoPP; inibidor da atividade enzimática - SnPP) na parasitemia e na carga parasitária em tecidos selecionados de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (cepa Y).

O tratamento com CoPP reduziu a parasitemia (7 e 8 dias pós-infecção) em relação ao grupo infectado não tratado (Fig. 3A). A SnPP, diferentemente, aumentou a parasitemia nos mesmos intervalos de tempo em relação ao grupo infectado não tratado com metaloporfirinas.

Como a infecção por *T. cruzi* é sistêmica, afetando diversos tecidos, avaliamos a carga parasitária nos tecidos cardíaco, muscular estriado (quadríceps femural) e hepático, no 14^o dia pós-infecção (14 dpi). Ocorreu uma diminuição significativa na carga parasitária em tecido cardíaco e muscular esquelético nos animais tratados com CoPP em relação aos animais infectados não tratados (Fig. 3B). Não houve diferença no parasitismo hepático entre os grupos.

O tratamento contínuo com CoPP, porém, leva a uma maior mortalidade após 15 dpi (100%), diferentemente do ocorrido com a suspensão do tratamento diário após 11 dpi com ausência de letalidade, durante 25 dias de observação após a infecção (dados não mostrados). O efeito tóxico do tratamento prolongado nos levou a parar o tratamento com CoPP no 11^o dpi, nos demais experimentos. O tratamento diário com SnPP não promoveu a morte de animais infectados, mesmo com prolongamento acima de 11 dpi (dados não mostrados).

A



B

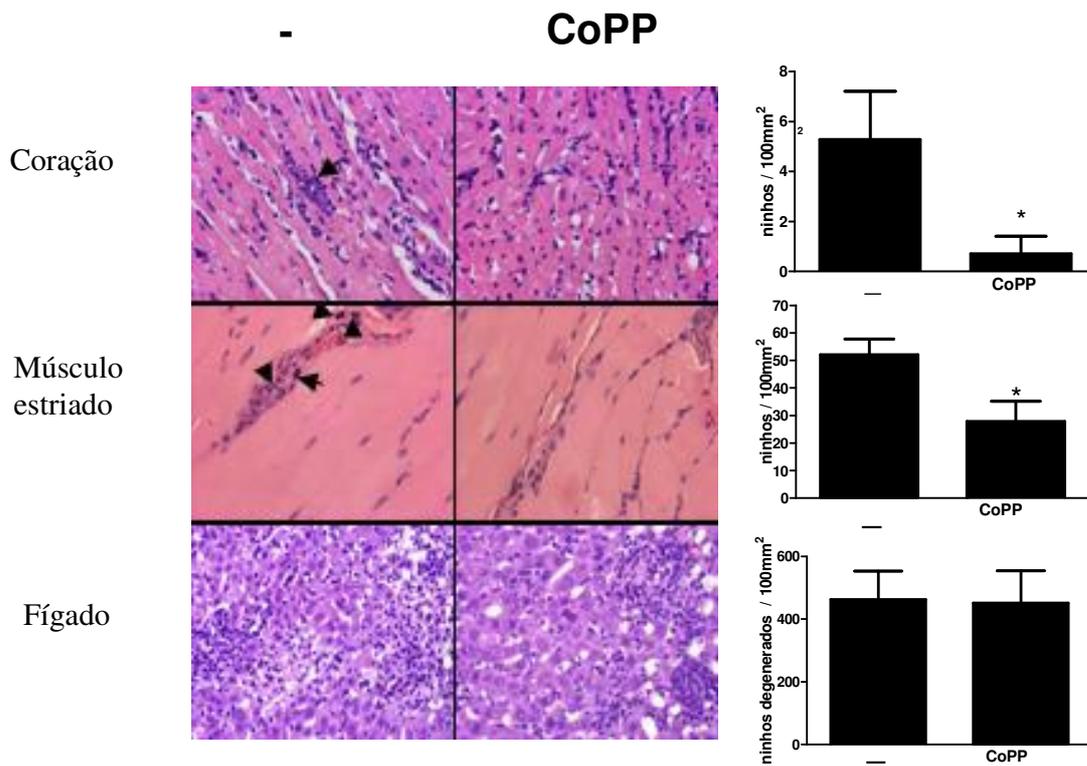


Figura 3 – Camundongos C57BL/6 foram tratados com CoPP (5mg/Kg), SnPP (5mg/Kg) ou veículo (-) i.p. 24h antes da infecção e a partir daí, diariamente. Em A, a infecção foi realizada por inoculação via i.p. com 10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. O gráfico é a média de 3 experimentos realizados (n=8). Em B, os órgãos (fígado, quadríceps e coração) foram retirados 14 dias pós-infecção para preparação de lâminas para histopatologia e quantificado o número de ninhos de amastigotas por secção de 100 mm² de lâminas de histopatologia. As setas mostram a presença de ninhos de amastigotas nos tecidos. *, p<0,05, comparado ao grupo infectado não tratado(-). Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes.

3 – A CoPP diminui a carga parasitária em macrófagos infectados *in vivo* e *ex vivo* e em linhagem de células THP-1 expressando HO-1.

A cepa Y de *T. cruzi* apresenta um tropismo diferenciado para fagócitos mononucleares, parasitando essas células no início da infecção. O efeito das metaloporfirinas sobre a infecção desse tipo celular foi avaliado utilizando diferentes abordagens. Daí diz cada uma e dá o resultado separadamente. Eu colocaria toda a descrição do exp com mac in vitro, incluindo a brb e bvd. Daí vai pro ex vivo e então THP1. Explicar mais objetivamente! Analisamos a carga parasitária de células peritoneais aderentes de camundongos infectados (*ex vivo*) e de macrófagos infectados *in vitro* com *T. cruzi*. Com este fim utilizamos macrófagos peritoneais (elicitados com tioglicolato) de camundongos C57BL/6 e células THP-1 (linhagem monocítica humana imortalizada).

Ex vivo, células aderentes de peritônio de animais C57BL/6 infectados e tratados com CoPP mostraram redução significativa no parasitismo na porcentagem de células infectadas em relação aos macrófagos de animais infectados e não tratados (Fig. 4A-B). O tratamento com SnPP aumentou o parasitismo e a porcentagem de células peritoneais aderentes de C57BL/6 infectados ($p < 0,05$)

In vitro, o tratamento com CoPP, diminuiu tanto a quantidade de amastigotas intracelulares em macrófagos (Fig. 4C) quanto a porcentagem de células infectadas (Fig. 4D). A SnPP, inversamente ao constatado para CoPP, aumentou ambos os parâmetros de parasitismo (quantidade de amastigotas intracelulares e porcentagem de células infectadas) em macrófagos. O tratamento conjunto com SnPP e CoPP reverteu o efeito de diminuição da carga parasitária e da porcentagem de macrófagos infectados observados com o tratamento com CoPP para valores semelhantes aos de macrófagos não tratados. A biliverdina e a bilirrubina (produtos de degradação da HO-1) promoveram uma diminuição significativa na carga parasitária de macrófagos quando comparadas ao grupo não tratado (Fig. 4E)

Em um experimento preliminar, a transfecção de células THP-1 com o plasmídeo contendo o gene da HO-1 (pHO-1) diminuiu significativamente a carga parasitária quando comparado ao controle transfectado com o plasmídeo vazio (mock) (Fig. 4E). De fato, a transfecção com HO-1 teve um efeito semelhante na carga parasitária ao

observado com o tratamento com a CoPP. A transfecção de com plasmídeo contendo *Hmox1* diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle (mock) de maneira semelhante ao observado para células THP-1 tratadas com CoPP.

Esse conjunto de dados sugerem que a CoPP e a SnPP atuam modulando a atividade biológica de macrófagos restringido ou aumento a replicação de amastigotas em células infectadas, possivelmente via HO-1.

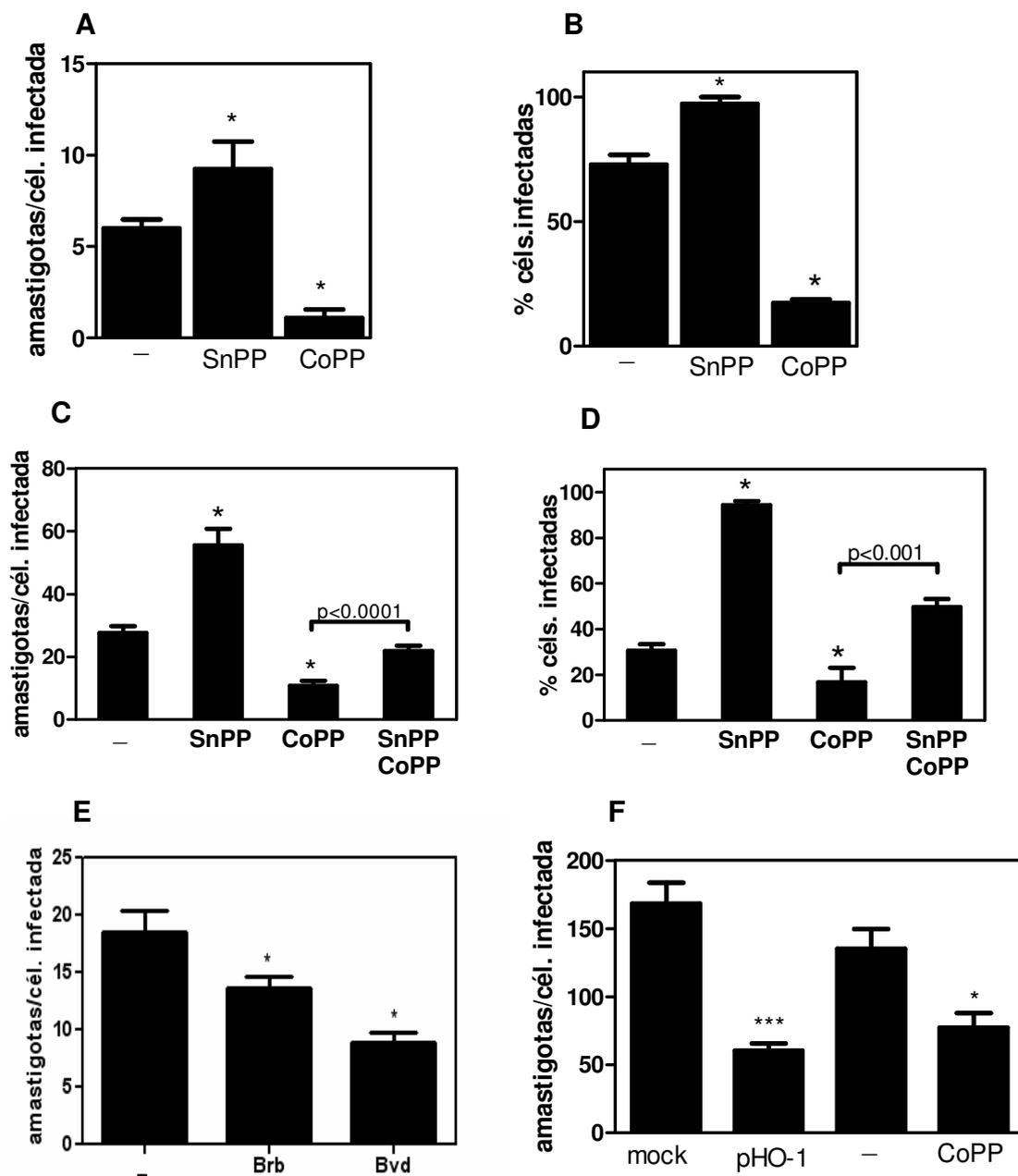


Figura 4 – A modulação da atividade enzimática de HO-1 afeta o parasitismo em fagócitos mononucleares murinos. Em A e B, respectivamente, carga parasitária e percentagem de células peritoneais aderentes (cultivo de 48h *ex vivo*) de camundongos 9 dpi tratados ou não com CoPP e SnPP. Em C e D, respectivamente, carga parasitária e percentagem de macrófagos infectados tratados ou não concomitantemente com CoPP (50 μ M) e SnPP (50 μ M), *in vitro*. Em E, carga parasitária de macrófagos infectados tratados ou não com Biliverdina (Bvd- 10 μ M) ou Bilirrubina (Brb-10 μ M). Em F, carga parasitária de células THP-1 aderentes transfectadas com plasmídeo contendo o gene *Hmox1* (pHO-1) ou não (mock) *, $p < 0,05$, comparado ao grupo infectado não tratado (-), ***, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo mock. Os gráficos acima são a média de 3 experimentos independentes.

4 - As metaloporfirinas não apresentaram efeito tripanocida direto

Em seguida avaliamos se a diminuição do parasitismo em macrófagos poderia dever-se ao efeito tóxico direto da CoPP no *T. cruzi*. Para tal, incubamos as formas tripomastigotas de *T. cruzi* por até 48 h em 50 uM das metaloporfirinas (SnPP e CoPP). Durante os tempos analisados, não houve perda significativa da viabilidade em relação ao grupo não tratado (Fig. 5)

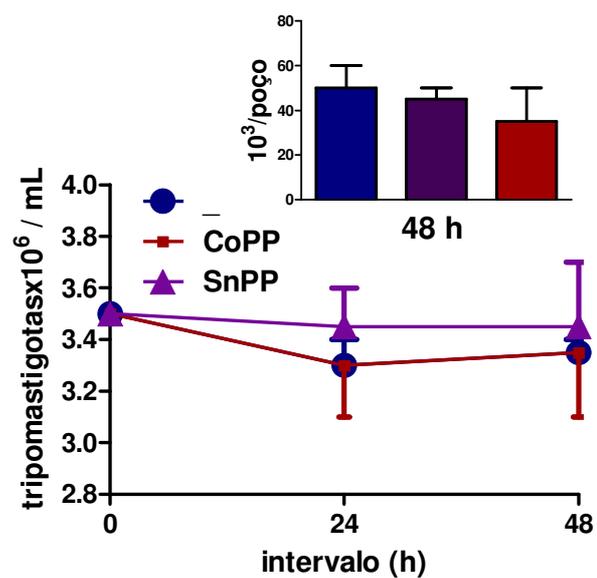


Figura 5 – As metaloporfirinas não apresentaram efeito tripanocida direto. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubadas por até 48h na presença ou não de 50 μ M das metaloporfirinas (SnPP e CoPP) e formas viáveis foram quantificadas através da motilidade. O inserto mostra o número de tripomastigotas mortos por poço. O gráfico acima é a média de 3 experimentos.

5- O efeito microbicida da indução de HO-1 independe da geração de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico tem sido descrito como o mais importante mecanismo microbicida no controle da infecção por *T. cruzi* (Vespa, Cunha & Silva, 1994). Avaliamos se a geração de NO poderia ser um mecanismo microbicida ativado pelo aumento de expressão de HO-1 em células infectadas por *T. cruzi*, apesar de, em macrófagos normais, a indução de HO-1 reduzir a expressão de iNOS e a produção de NO (Ashino et al., 2008). Utilizamos camundongos C57BL/6 em experimentos *ex vivo* e *in vitro* e camundongos geneticamente deficientes de iNOS *-/-* (óxido nítrico sintetase induzida) *in vivo* e *in vitro*.

As células peritoneais provenientes de camundongos C57BL/6 infectados (9 dpi), tratados *in vivo* com SnPP ou CoPP, apresentaram uma diminuição significativa na secreção de NO na presença ou ausência do estímulo com LPS em comparação ao grupo não tratado (Fig 6A). *In vitro*, macrófagos infectados de C57BL/6 estimulados com LPS e tratados com CoPP apresentaram uma diminuição na secreção de NO, quando comparados aos grupos não tratado ou tratado com SnPP ($p < 0,001$) (Fig 6B). Estes dados sugerem que a produção de NO não é responsável pelo efeito da CoPP na redução do parasitismo de macrófagos *in vivo* e *in vitro*.

Macrófagos peritoneais de animais iNOS $-/-$ infectados *in vitro* com *T. cruzi* apresentaram carga parasitária superior ao de controles iNOS $+/+$ C57BL/6, confirmando o papel importante desempenhado pelo NO no controle da infecção (Fig 6C). Macrófagos de camundongos iNOS $-/-$ infectados *in vitro* e tratados com CoPP apresentaram uma diminuição significativa na quantidade amastigotas, enquanto que o tratamento com SnPP aumentou a carga parasitária nas células infectadas, quando comparados ao grupo não tratado (Fig 6C). Esses resultados indicam que os efeitos da CoPP e da SnPP sobre a carga parasitária de macrófagos são independentes da expressão de iNOS. *In vivo*, a parasitemia de camundongos iNOS $-/-$ tratados com CoPP foi menor em relação ao grupo não tratado em todos os tempos avaliados (Fig 6D). Os animais tratados com SnPP apresentaram uma parasitemia inicial aumentada em relação ao grupo não tratado no oitavo dia pós-infecção e sucumbiram

precocemente à infecção. Estes resultados indicam que tanto *in vitro* quanto *in vivo* o efeito da CoPP é independente de NO.

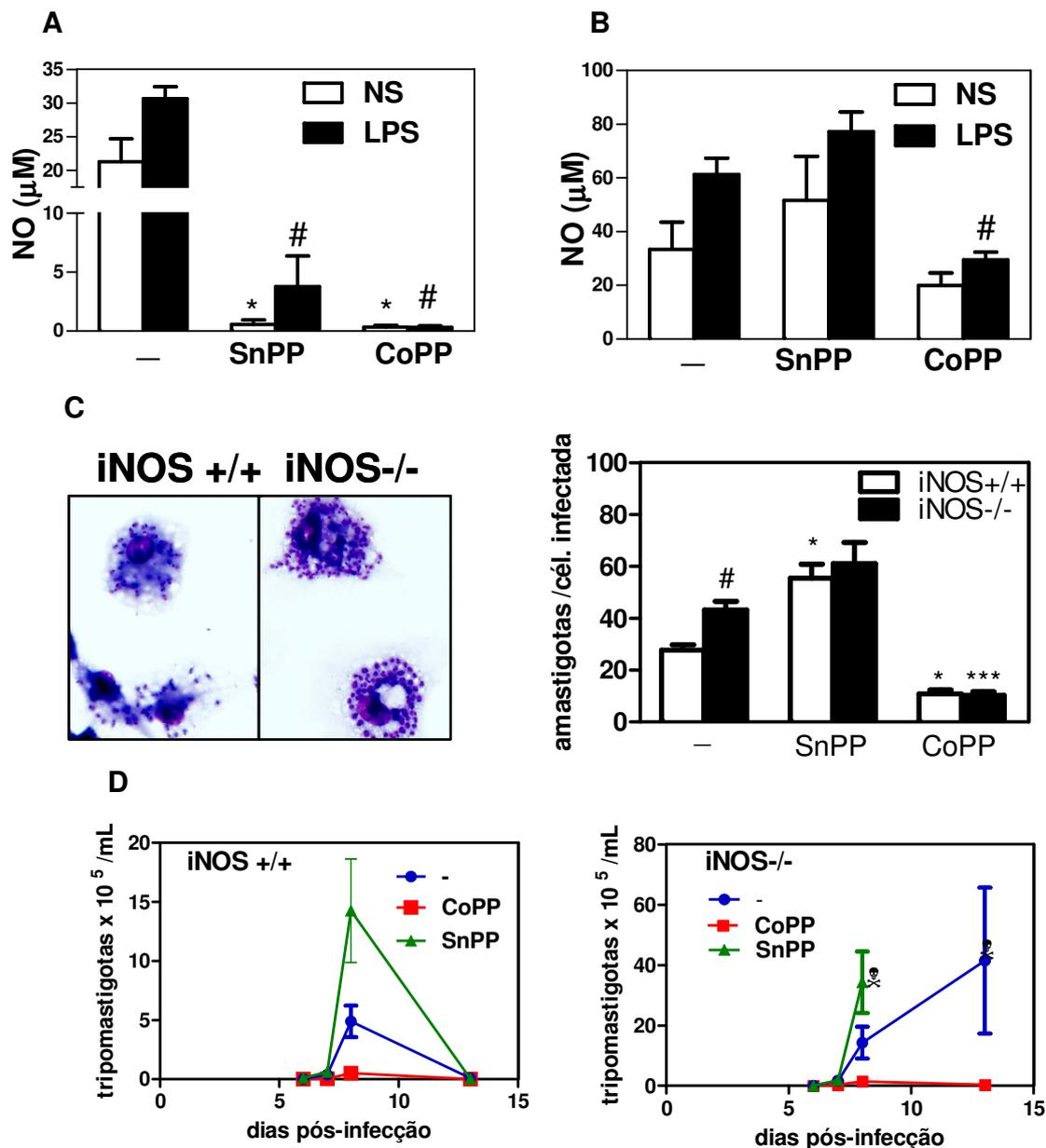


Figura 6 – O efeito tripanocida da CoPP não depende da secreção de NO. Em A, secreção de NO por células peritoneais de animais C57BL/6 infectados e tratados ou não com CoPP ou SnPP 9 dpi reestimulados ou não com LPS (100 ng/mL). *, $p < 0,01$, comparados ao grupo infectado (-); #, $p < 0,01$ comparado ao grupo infectado (-) reestimulado com LPS. Em B, secreção de NO por macrófagos peritoneais de C57BL/6 tratados ou não com CoPP, SnPP (50 μ M). #, $p < 0,01$, comparado ao grupo infectado estimulado com LPS (-). Em C, parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos iNOS $-/-$ e $+/+$ (lado esquerdo – foto ilustrativa; lado direito – gráfico de parasitismo) infectados tratados ou não com CoPP e SnPP (50 μ M). ***, $p < 0,001$, quando comparado ao grupo. iNOS $-/-$ não tratado (-); #, $p < 0,05$, comparado ao grupo iNOS $+/+$; *, $p < 0,01$, quando comparado ao grupo iNOS $+/+$ não tratado (-). Em D, parasitemia de camundongos ($n=5$) iNOS $-/-$ (lado direito) e $+/+$ (lado esquerdo). Os gráficos acima são a média de 2 experimentos.

6- O efeito microbicida da indução de HO-1 independe da secreção do fator de necrose tumoral (TNF).

O TNF é um mediador inflamatório importante na fase aguda da infecção por *T. cruzi* por aumentar a atividade tripanocida de macrófagos infectados (Santos Lima et al., 1997). Avaliamos se a secreção de TNF poderia estar envolvida na ativação de mecanismos tripanocidas mediados pela indução de HO-1. Utilizamos camundongos C57BL/6 em experimentos *in vitro* e *ex vivo* e camundongos deficientes em uma das subunidades do receptor de TNF (TNF R1^{-/-}).

Em experimentos *ex vivo*, células de peritônio de camundongos C57BL/6 (9 dpi) infectados e tratados com CoPP não apresentaram diferença na secreção de TNF reestimuladas ou não com LPS, em relação às células de peritônio de animais infectados não tratados (Fig. 7A). O tratamento com SnPP diminuiu a secreção de TNF em relação ao grupo não tratado. *In vitro*, macrófagos de C57BL/6 tratados ou não com as metaloporfirinas não apresentaram diferenças na secreção de TNF (Fig. 7B)

Macrófagos peritoneais de camundongos TNFR1^{-/-} infectados *in vitro* com *T. cruzi* apresentaram carga parasitária maior do que o dos controles TNFR1^{+/+} C57BL/6, confirmando que TNF/TNFR1 participam do controle da carga parasitária. O tratamento de macrófagos TNFR1^{-/-} com CoPP reduziu a carga parasitária em relação ao grupo não tratado (Fig. 7C). Já macrófagos TNFR1^{-/-} tratados com SnPP não tiveram diferença na carga parasitária quando comparados a macrófagos TNFR1^{-/-} não tratados.

In vivo, a CoPP reduziu a parasitemia de camundongos TNFR1^{-/-} (8 dpi) e TNFR1^{+/+} de maneira semelhante (Fig. 7D). Em conjunto, estes resultados indicam que a ativação do TNFR1 não participa do efeito da CoPP.

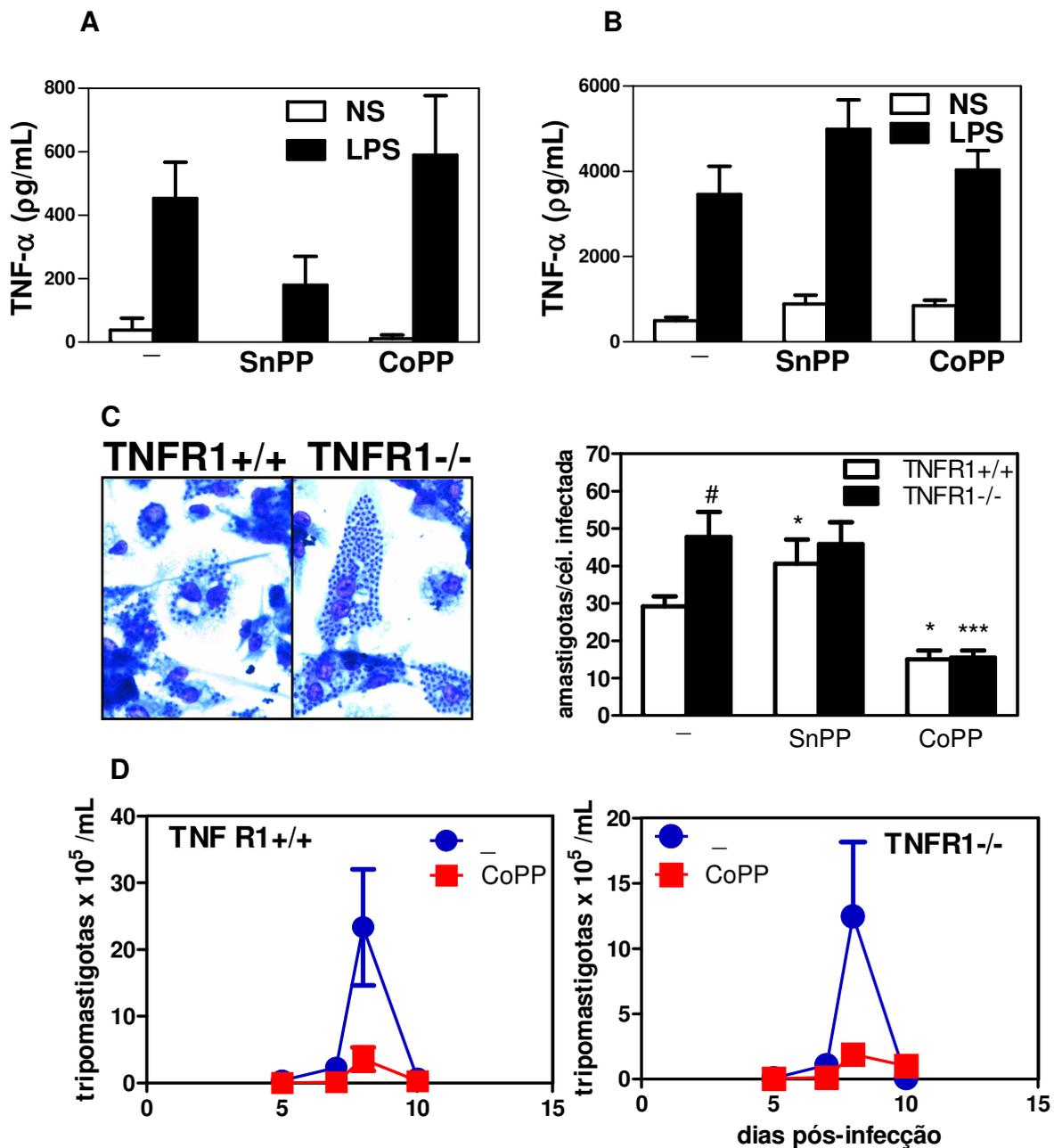


Figura 7 – O efeito tripanocida da CoPP não depende de TNF. Em A, secreção de TNF por células peritoneais de animais C57BL/6 infectados (9 dpi) e tratados ou não com CoPP ou SnPP reestimulados ex vivo ou não com LPS. Em B, secreção de TNF por macrófagos peritoneais de C57BL/6 infectados tratados ou não com CoPP (50 μ M) ou SnPP (50 μ M). Em C, parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos TNF R1 $-/-$ (elicitados de tioglicolato) (lado esquerdo – foto ilustrativa; lado direito – gráfico de parasitismo) infectados tratados ou não com CoPP (50 μ M), SnPP (50 μ M) por 48h. *******, $p < 0,001$, quando comparado ao grupo TNF R1 $-/-$ não tratado (-). Em D, parasitemia de camundongos TNF R1 $+/+$ e $-/-$. O gráficos acima são a média de 2 experimentos.

7 - O efeito tripanocida da CoPP é parcialmente dependente de atividade antioxidante

O estresse oxidativo tem sido relacionado com o desenvolvimento da doença de Chagas e de outras tripanossomíases (Saleh et al, 2009; Igbokwe et al, 1994; Gupta 2009). Uma vez que os produtos de degradação da HO-1 (biliverdina, bilirrubina e CO) apresentam atividade antioxidante (Stocker et al., 1987), investigamos se essa atividade poderia estar relacionada aos efeitos protetores induzidos pelo aumento da HO-1 por CoPP. Para isso, avaliamos se o uso de drogas moduladoras do estresse oxidativo celular juntamente com CoPP e SnPP alteraria a carga parasitária de macrófagos infectados *in vitro*.

A NAC (precursores da GSH) promoveu a diminuição na carga parasitária de macrófagos infectados ($p < 0,001$) e tratados com SnPP ($p < 0,001$). Porém, a NAC não apresentou efeito somatório quando adicionado a CoPP (Fig. 8A). Macrófagos de camundongos deficientes de gp91phox^{-/-} (uma das subunidades do complexo da NADPH oxidase) também apresentaram uma diminuição na carga parasitária quando comparados a macrófagos infectados de camundongos selvagens (Fig. 8B). O tratamento de macrófagos de gp91phox^{-/-} com CoPP não diminuiu a carga parasitária quando comparado aos macrófagos de gp91phox^{-/-} não tratados. A SnPP foi incapaz de aumentar a carga parasitária de macrófagos gp91phox^{-/-} infectados. Comparados aos grupos gp91phox^{+/+} C57BL/6 tratados com CoPP ou SnPP, os macrófagos de gp91phox^{-/-} mantiveram carga parasitária sempre menor ($p < 0,001$).

O paraquat, droga indutora de estresse oxidativo, (por inibidor o complexo I mitocondrial) induziu a morte celular dos macrófagos infectados no tempo de avaliação da carga parasitária. Entretanto, quando incubado simultaneamente com CoPP, os macrófagos sobreviveram, confirmando os efeitos citoprotetores da CoPP. A presença do paraquat aumentou significativamente a carga parasitária *in vitro* em macrófagos infectados tratados com CoPP comparados aos tratados apenas com CoPP ($p < 0,01$) (Fig. 8C) sugerindo que a CoPP atua através da redução do stress oxidativo produzido pela infecção na redução da carga parasitária.

A degradação ou modificação de hemeproteínas por oxidação pode levar à liberação de ferro e, este catalisado pela reação de Fenton, resultar em formação de ROS (Rush e Koppenol, 1986). Analisamos, portanto o papel do ferro como indutor de estresse oxidativo na infecção *in vitro* de macrófagos infectados, uma vez que a depleção de ferro diminui a carga parasitária em macrófagos infectados (Loo; Lalonde. 1984). Heme (ferro protoporfirina IX), metaloporfirina que contém um átomo ferro, diminuiu a carga parasitária ($p < 0,01$) em relação ao grupo não tratado, porém, reverteu a redução de carga promovida pela CoPP (Fig. 8C) ($p < 0,0001$). A adição de sulfato ferroso, cujo átomo de ferro está no estado redox $2+$, em cultura de macrófagos infectados, também reverteu a redução promovida pela CoPP ($p < 0,05$). Esse conjunto de resultados sugere que a CoPP diminui a carga parasitária de macrófagos infectados, através da diminuição do estresse oxidativo promovido pela infecção por *T. cruzi*.

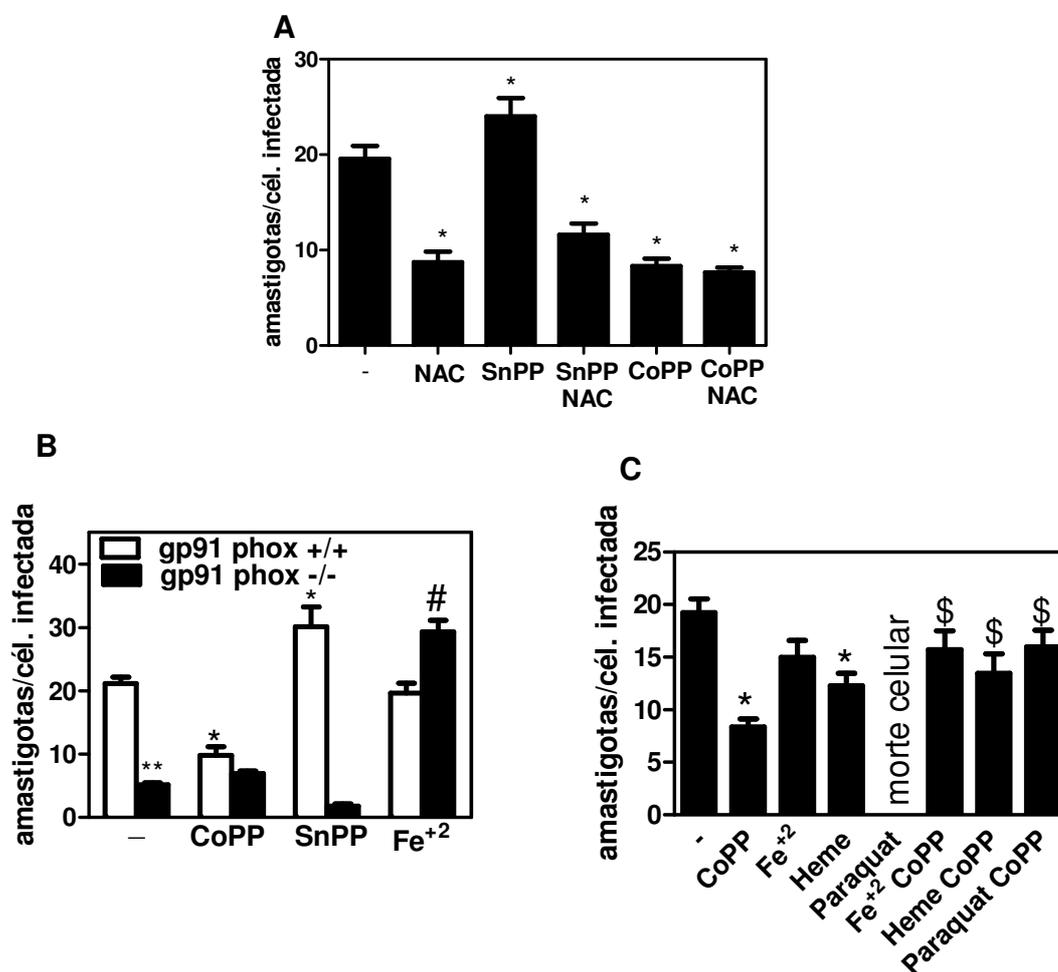


Figura 8 – Antioxidantes reduzem o parasitismo em macrófagos *in vitro*. (A) Parasitismo de macrófagos peritoneais de C57BL/6 tratados com CoPP (50 μ M), SnPP (50 μ M) e NAC (10 mM).*, $p < 0,001$ comparado ao grupo infectado não tratado. (B) parasitismo de macrófagos peritoneais de C57BL/6 (gp91 phox +/+) e de gp91 phox -/- tratados com FeSO₄ (50 μ M), SnPP (50 μ M) e CoPP (50 μ M). *, $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não tratado (-); **, $p < 0,001$ quando comparado ao grupo gp91 phox +/+ não tratado; #, $p < 0,001$, quando comparado ao grupo gp91 phox +/+ tratado com Fe²⁺. (D) Parasitismo de macrófagos peritoneais de C57BL/6 tratados com: CoPP (50 μ M), paraquat (100 μ M), FeSO₄ (50 μ M), Heme (50 μ M). *, $p < 0,01$ comparado ao grupo infectado não tratado; \$, $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo tratado com CoPP. Os gráficos acima são a média de 3 experimentos..

8- O efeito tripanocida da CoPP depende parcialmente do IFNAR1 em macrófagos, mas não de PKR.

A secreção de IFN I é importante mecanismo de defesa na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Costa et al., 2006; Koga et al., 2006). Como a expressão de HO-1 em células mielóides é indispensável à expressão de IFN- β induzida por alguns estímulos conhecidos (Tziman et al, 2009), avaliamos *in vitro* a carga parasitária de macrófagos infectados tratados com CoPP ou com produtos de degradação da HO-1 (Biliverdina e Bilirrubina) utilizando macrófagos de camundongos sv129 selvagens e deficientes do receptor de IFN I (IFNAR $^{-/-}$). *In vivo*, avaliamos a parasitemia de camundongos selvagens e IFNAR $^{-/-}$ tratados com CoPP.

Como era esperado, a CoPP, biliverdina e bilirrubina causaram redução da carga parasitária de macrófagos IFNAR1 $^{+/+}$ ($p < 0.0001$). Entretanto tais porfirinas reduziram apenas parcialmente a carga parasitária em macrófagos IFNAR $^{-/-}$ em relação ao grupo não tratado ($p < 0.01$) (Fig. 9A). tratamento com SnPP diminuiu a carga parasitária em macrófagos IFNAR $^{-/-}$ em relação a macrófagos IFNAR $^{+/+}$ recebendo o mesmo tratamento ($p < 0,001$) De maneira semelhante, o aumento da carga parasitária, mediado por SnPP, não foi observado nos animais IFNAR $^{-/-}$. Esses dados sugerem que o efeito da CoPP pode ser mediado via aumento da expressão de IFN do tipo I ou de moléculas efetoras da sua via de sinalização.

Uma vez que a PKR é uma das moléculas efetoras da via de sinalização de IFN- α/β (Marcus & Sekellic, 1988), nós avaliamos seu papel na modulação da infecção por CoPP. Para isso, macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* e tratados com CoPP, na presença ou ausência de 2-aminopurina (2-AP), um inibidor de PKR. Não houve diferença na carga parasitária de macrófagos tratados com 2-AP em relação ao grupo não tratado (Fig 9B)

Na cinética de *ifnb* avaliada por RT-PCR, o tratamento de macrófagos com CoPP diminuiu a expressão de *ifnb* em todos tempos avaliados (Fig 9C). Não houve alteração na cinética de *ifnb* em macrófagos tratados com SnPP e biliverdina em comparação à cinética de macrófagos somente infectados. Na expressão protéica da fosforilação de

IRF3 não houve diferença na expressão de IRF-3-P entre macrófagos infectados tratados ou não com CoPP nos tempos de 9 h e 10 h (Fig. 9D).

In vivo, o tratamento com CoPP diminuiu de maneira semelhante a parasitemia de camundongos IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-} (Fig. 9E), indicando que embora exista uma participação de IFN do tipo I na atividade microbicida de macrófagos estimulada pela CoPP, biliverdina e bilirrubina, não há participação relevante desse mecanismo na redução da carga parasitária pela CoPP *in vivo*.

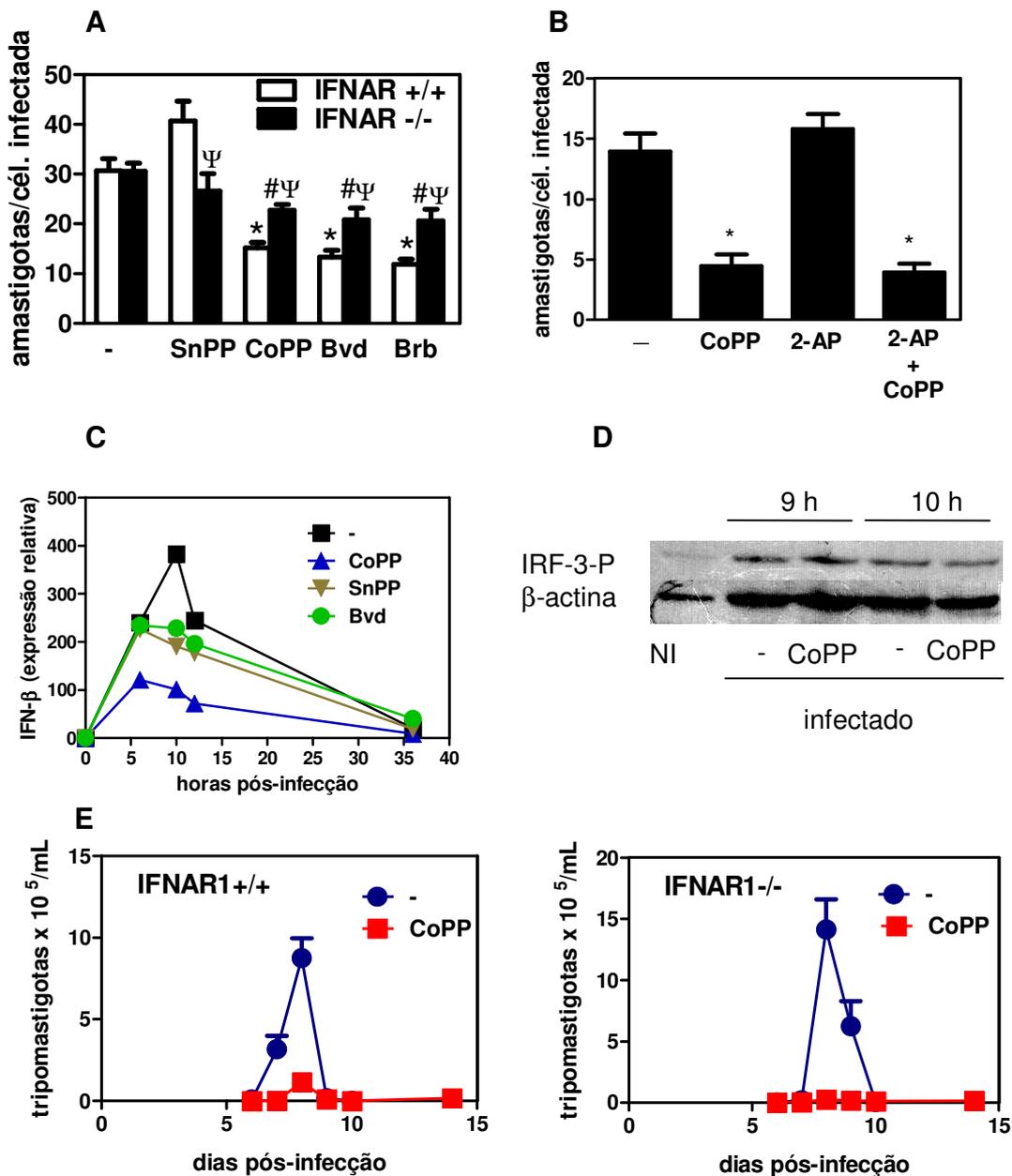


Figura 9 – O efeito tripanocida da CoPP e dos produtos de degradação do heme *in vitro* depende parcialmente de IFN I. Em A, parasitismo de macrófagos elicitados de sv129 IFNAR +/+ e IFNAR -/- infectados tratados ou não com SnPP (50 μM), CoPP (50 μM), Biliverdina (50 μM) e Bilirrubina (10 μM). Ψ, p<0,001 comparado ao grupo WT recebendo o mesmo tratamento; * p<0,0001, comparado ao grupo IFNAR +/+ não tratado (-); # p<0,001, comparado aos macrófagos IFNAR -/- infectados não tratados. Em B, parasitismo de macrófagos de C57BL/6 tratados ou não com CoPP e 2-AP. *, p<0,001 comparado com o grupo controle. Em C, cinética da expressão gênica de *ifnb* em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* tratados ou não com as porfirinas. Em D, expressão de IRF-3 fosforilado por imunoblot nos tempos de 9 h e 10 h em macrófagos infectados com *T. cruzi*. Em E, parasitemia de camundongos sv129 IFNAR +/+ (lado esquerdo) e IFNAR -/- (lado direito). O gráficos acima são a média de 2 experimentos.

9- O tratamento com CoPP diminui a celularidade no baço na infecção por *T. cruzi*, mas não interfere na apoptose de células T.

A indução de HO-1 produz tanto uma diminuição no estado de ativação celular como previne a apoptose de diversos tipos celulares (Gozzelino, Jeney & Soares, 2010). A infecção aguda por *T. cruzi* tem como característica promover o aumento do baço (esplenomegalia), indicando a ativação policlonal de esplenócitos, processo que precede a apoptose de linfócitos T (Minoprio et al., 1986). Avaliamos se o tratamento com a CoPP poderia alterar a esplenomegalia e a apoptose de linfócitos T de camundongos C57BL/6 infectados.

O tratamento com CoPP preveniu significativamente o aumento do número de esplenócitos e o tamanho do baço (dados não mostrados) de animais infectados (9 dpi) quando comparado ao grupo não tratado (Fig 10A). O tratamento diário com SnPP não alterou a quantidade de células por baço quando comparado ao grupo não tratado.

A CoPP não alterou a percentagem de linfócitos T CD4, porém diminui parcialmente de T CD8 em apoptose (células anexina +) quando comparados a linfócitos de animais infectados (Fig. 10B). A SnPP aumentou a percentagem de apoptose de ambas subpopulações de linfócitos avaliadas (Fig.10B). Estes resultados sugerem que, embora o tratamento de CoPP não tenha reduzido significativamente a percentagem de apoptose na infecção, a inibição da atividade enzimática da HO-1 (pela SnPP) parece ter papel importante na regulação da apoptose em populações de linfócitos T durante a infecção por *T. cruzi*.

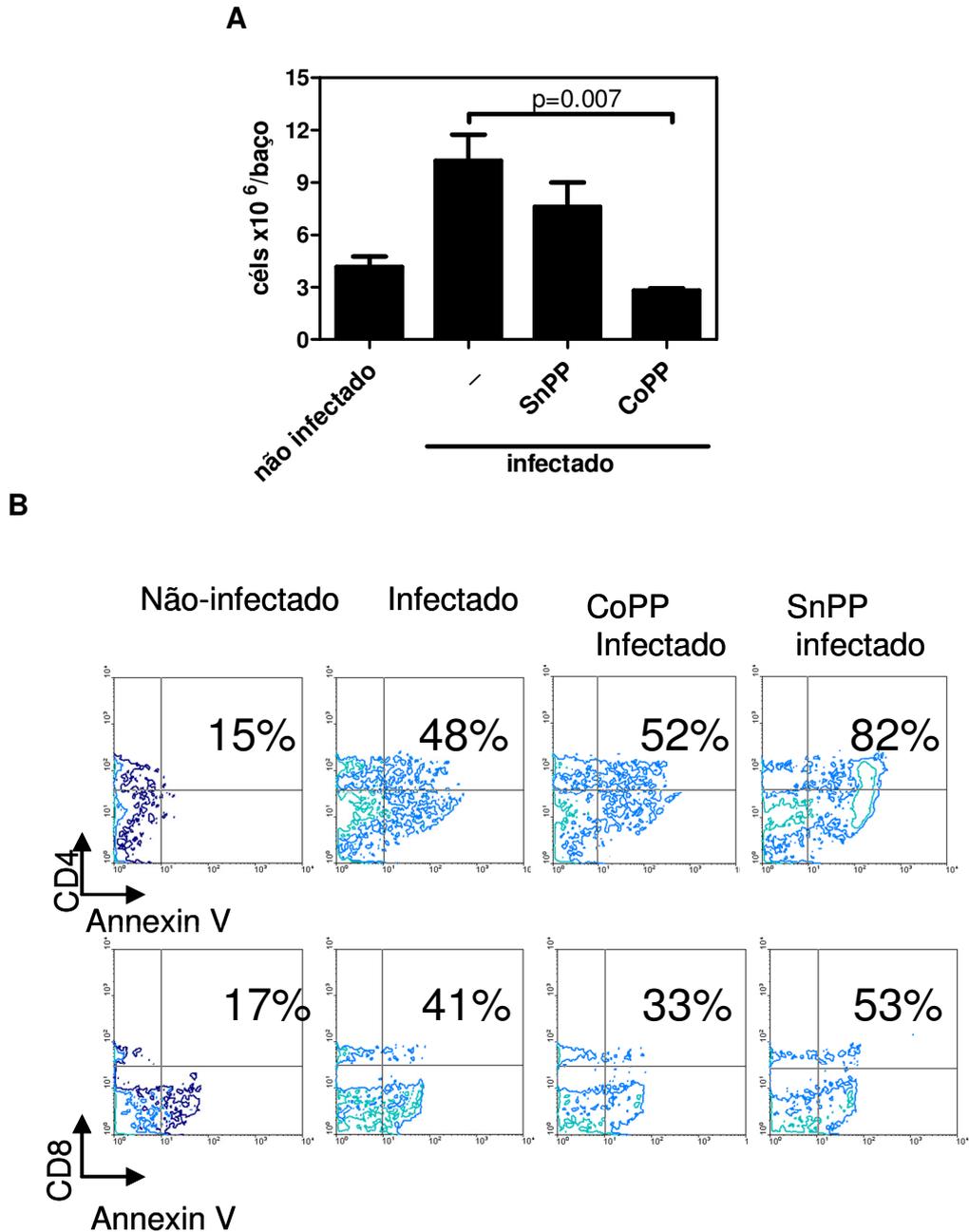


Figura 10 – O tratamento com CoPP previne a esplenomegalia mas não a apoptose em linfócitos T do baço. Em A, quantificação de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 9 dpi tratados ou não com CoPP e SnPP. Em B, ensaio de anexina-PI de subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 de camundongos C57Bl/6 infectados 9 dpi tratados ou não com CoPP e SnPP. Os gráficos acima são a média de 3 experimentos.

10-O tratamento com CoPP não altera a resposta imune mediada por linfócitos T na infecção por *T. cruzi*.

HO-1 apresenta efeito imunoregulador sobre a resposta imune inata e adaptativa (Poss & Tonegawa, 1997a, 1997b; Otterbein et al., 2003). Como a resposta imune celular é importante no controle da infecção por *T. cruzi* (Martin & Tarleton, 2004), decidimos avaliar se a HO-1 poderia estar afetando a resposta imune celular na infecção por *T. cruzi*. Para tal, avaliamos a produção de citocinas *ex vivo* por esplenócitos reestimulados por mitógenos. O reestímulo *ex vivo* com o anticorpo anti-CD3 (α CD3) não alterou o perfil de citocinas (IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ) de esplenócitos de animais tratados com CoPP em comparação com os demais grupos avaliados (Fig 11). O tratamento com SnPP aumentou a produção de IL-10 pelos esplenócitos reestimulados quando comparada à produção de esplenócitos de animais infectados sem tratamento (Fig. 11D).

Também avaliamos a participação de linfócitos T CD8 através da percentagem de esplenócitos CD8 ativados de camundongos infectados 9 dpi e da parasitemia e letalidade de camundongos geneticamente deficientes de linfócitos T CD8 (CD8 $-/-$), de perforina (PKO $-/-$) e de IFN- γ (IFN- γ $-/-$).

Não houve alteração na percentagem de linfócitos T CD8⁺ e com perfil ativado (CD8⁺CD69^{high}) no baço de camundongos infectados tratados ou não com CoPP ou SnPP (Fig. 12).

Não houve diferença no perfil de parasitemia de camundongos CD8 $-/-$, IFN- γ $-/-$ e PKO $-/-$ em relação aos seus respectivos controles de animais selvagens, cujo tratamento com CoPP diminuiu a parasitemia (Fig 13A, 14A, 15A). Houve uma diferença significativa na cinética de letalidade nos camundongos CD8 $-/-$, IFN- γ $-/-$ e PKO $-/-$ tratados com CoPP em relação aos respectivos animais geneticamente deficientes não tratados (Fig. 13B, 14B, 15B). Esse conjunto de dados sugere que os efeitos tripanocidas do tratamento com CoPP não atuam na resposta imune mediada por linfócitos T.

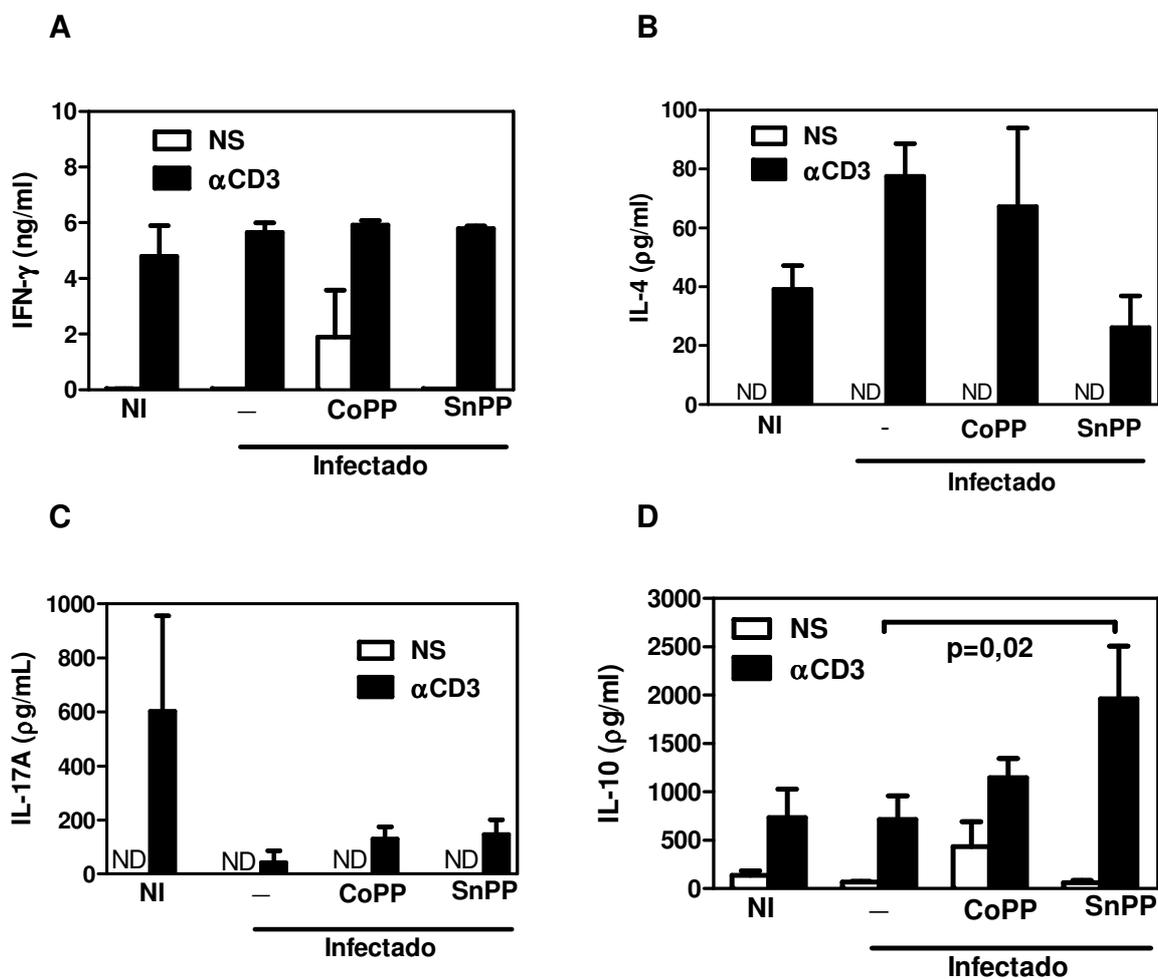


Figura 11 – O tratamento com metaloporfirinas não altera a secreção de citocinas de esplenócitos reestimulados ex vivo. Os esplenócitos de animais infectados 9 dpi foram reestimulados com anti-CD3 (5 ug/mL) por 48 h e o sobrenadante foi coletado e quantificado de IFN- γ (A), IL-4 (B), IL-17A (C) e IL-10 (D). Os gráficos acima são a média de 3 experimentos.

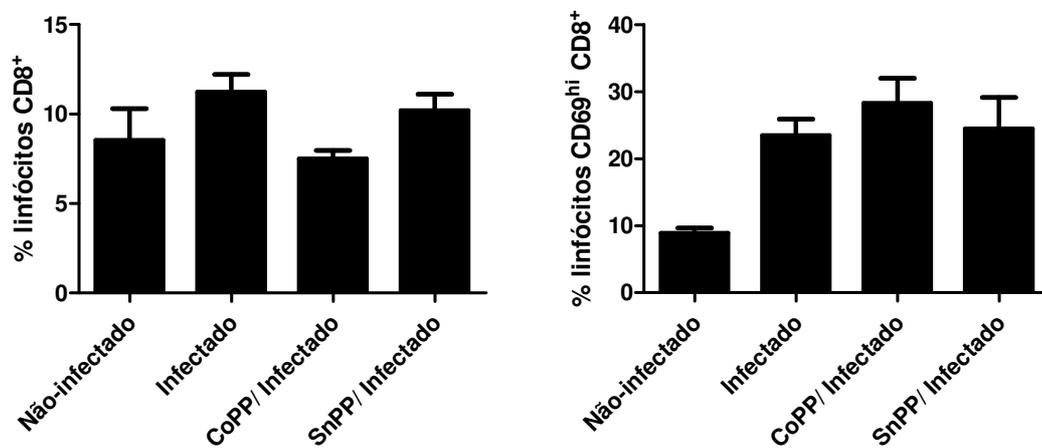
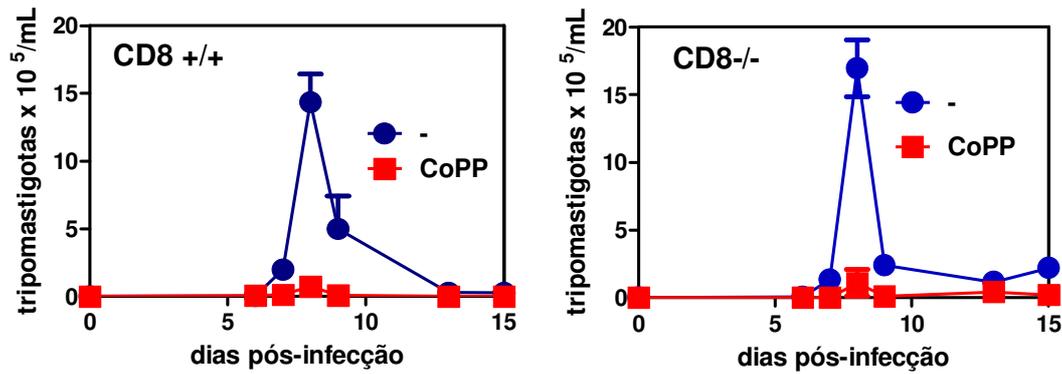


Figura 12 – O tratamento com metaloporfirinas não altera o perfil de linfócitos T CD8⁺ no baço de animais infectados. Esplenócitos de camundongos infectados 9 dpi tratados ou não com as metaloporfirinas foram coletados e marcados com anticorpos anti-CD8 e anti-CD69 para quantificação de células T CD8⁺ e CD69⁺ por citometria de fluxo. O gráfico acima é a média de 3 experimentos.

A



B

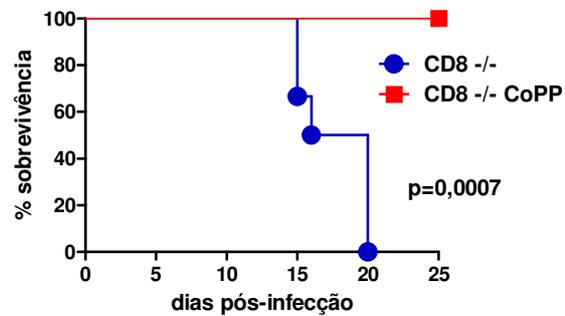


Figura 13- O tratamento com CoPP diminui a parasitemia em camundongos CD8 -/- e previne a mortalidade em camundongos CD8 -/-. A infecção foi realizada por inoculação via i.p. com 10⁴ tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Em A, parasitemia de camundongos (n=5) CD8 +/+ (lado esquerdo) e -/- (lado direito). Em B, curva de sobrevivência de camundongos CD8 -/- tratados ou não com CoPP. O gráfico acima é a média de 2 experimentos.

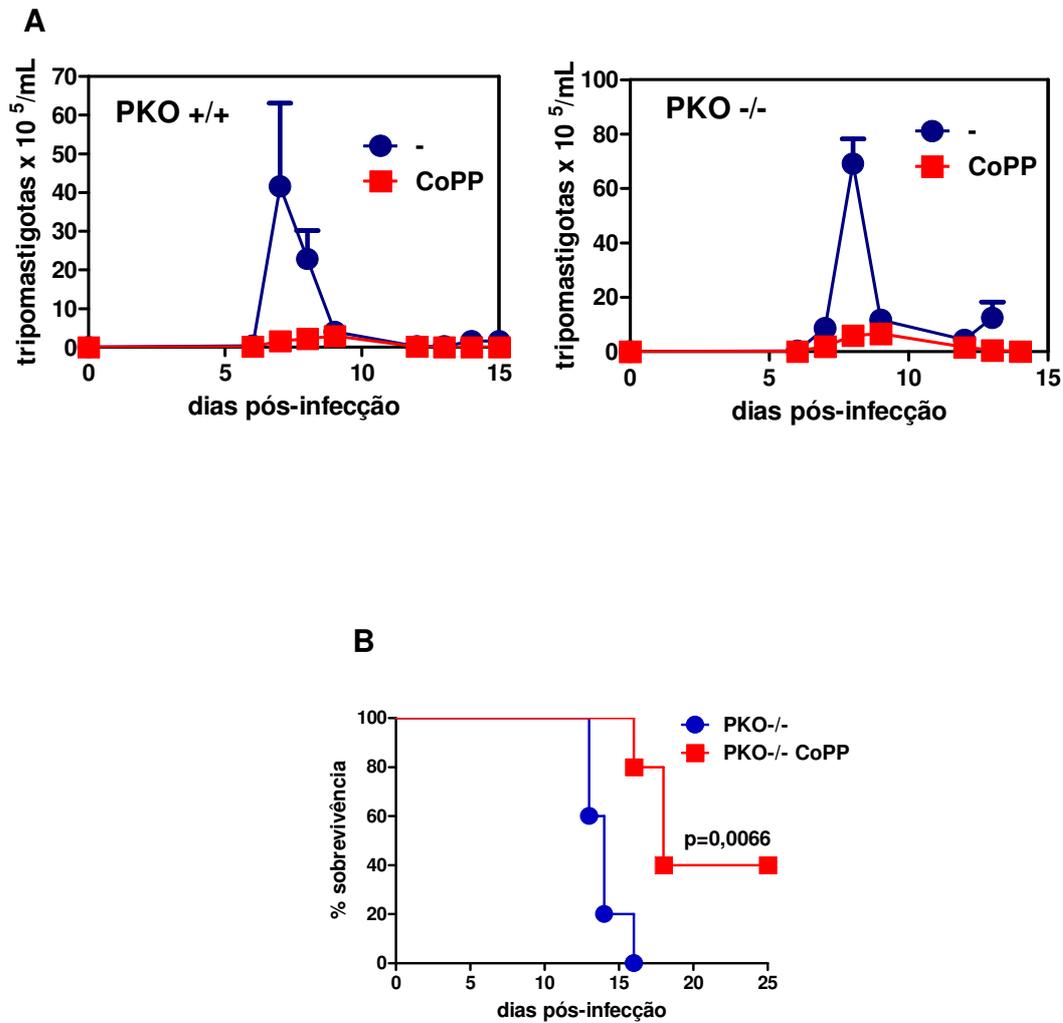


Figura 14 – O tratamento com CoPP diminui a parasitemia e aumenta a sobrevivência de camundongos PKO -/-. A infecção foi realizada por inoculação via i.p. com 10⁴ tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Em A, parasitemia de camundongos (n=5) PKO +/+ (lado esquerdo) e -/- (lado direito). Em B, curva de sobrevivência de camundongos PKO -/- tratados ou não com CoPP. O gráfico acima é a média de 2 experimentos.

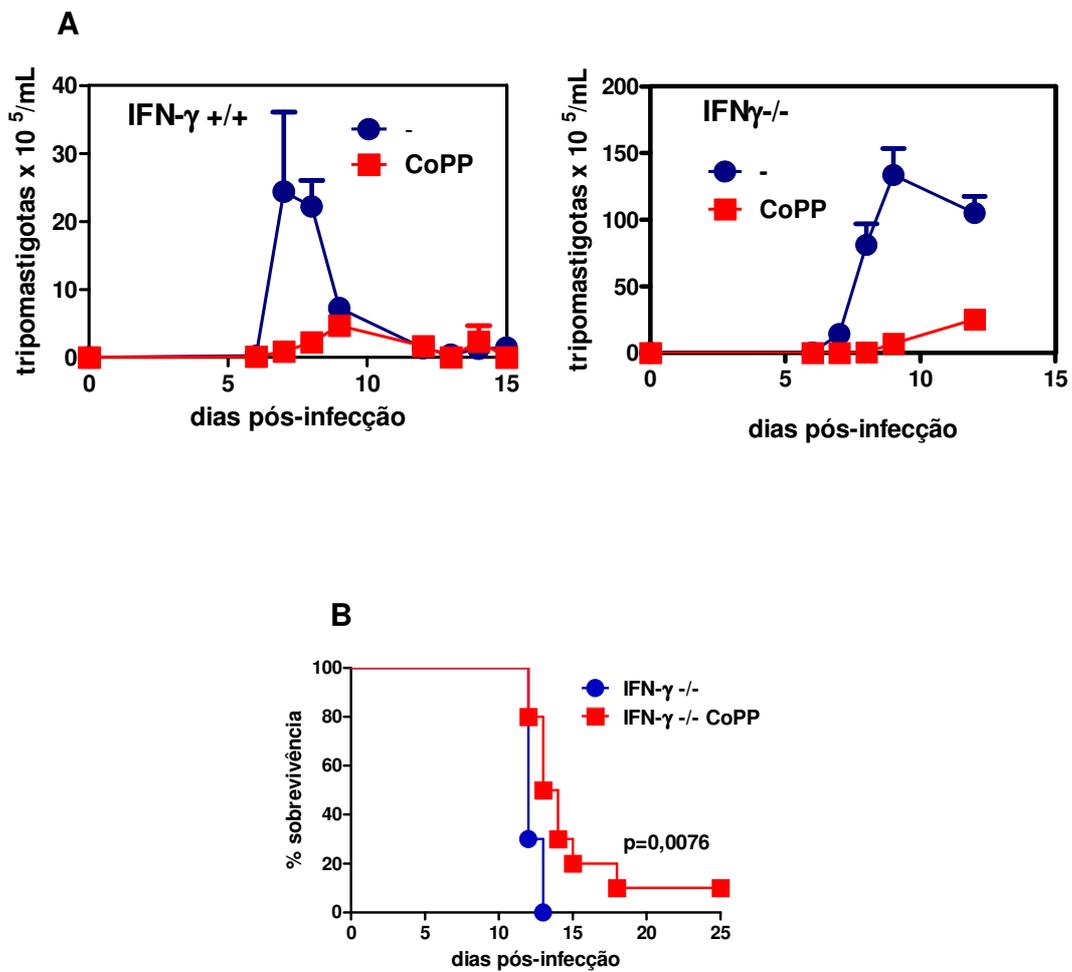


Figura 15 – O tratamento com CoPP diminui a parasitemia e aumenta a sobrevivência de camundongos IFN- γ -/-. A infecção foi realizada por inoculação via i.p. com 10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Em A, parasitemia de camundongos (n=5) IFN- γ +/+ (lado esquerdo) e -/- (lado direito). Em B, curva de sobrevivência de camundongos IFN- γ -/- tratados ou não com CoPP. O gráfico acima é a média de 2 experimentos.

DISCUSSÃO

As heme-oxigenases são enzimas conservadas evolutivamente, com função de degradação do heme. A HO-1 é uma dessas isoformas, sendo a única induzida, e a principal na degradação do heme em vários tecidos. Devido ao aumento de expressão frente à diferentes estímulos físicos e químicos, a indução de HO-1 parece ser essencial em resposta a vários tipos de reação aguda e de proteção celular após injúria. Essa noção é importante pelo fato de que a HO-1 está envolvida no catabolismo do heme, mas também, na geração de bilirrubina, biliverdina e CO, metabólitos com propriedades citoprotetoras e imunomoduladoras (Stocker et al, 1987). A HO-1 também tem um papel importante no controle de infecções intracelulares como HIV (Devadas & Dhawan, 2006), hepatite B (Protzer et al., 2007) e C (Shan et al., 2007), malária (Pamplona et al., 2007) e por *Salmonella* (Zaki et al., 2009). Essa proteção induzida por HO-1 durante infecções intracelulares nos estimulou a investigar os efeitos da indução de HO-1 na infecção por *T. cruzi*.

As metaloporfirinas, CoPP e SnPP, são conhecidas na literatura científica como drogas moduladoras da expressão e da atividade enzimática da HO-1. Como mostrado na figura 2, a CoPP de fato aumenta a expressão de HO-1 tanto em macrófagos infectados ou não. A SnPP também aumentou a expressão de de HO-1, porém seu efeito é em inibir a atividade enzimática da HO-1, e o aumento da expressão da enzima em macrófagos incubados com SnPP pode representar uma forma de tentar compensar a perda de atividade enzimática.

Inicialmente, avaliamos a parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, com o tratamento diário de CoPP e SnPP. O tratamento com as metaloporfirinas alterou a cinética de parasitemia nos animais infectados com efeitos opostos (Fig. 3A). O tratamento com CoPP provocou um decréscimo na carga parasitária do sangue e nos tecidos musculares (Fig.3A-B) e o tratamento com SnPP teve um efeito oposto na parasitemia dos animais infectados (Fig. 3A).

Os macrófagos representam, inicialmente, um importante sítio de replicação e de controle em camundongos infectados (Ortiz-Ortiz et al., 1976) especialmente para cepa Y que apresenta um tropismo diferenciado para fagócitos mononucleares. Como

mostrado neste trabalho, o tratamento com CoPP restringiu a replicação de amastigotas, e diminuiu a percentagem de macrófagos infectados tanto *in vitro* como *ex vivo* de camundongos C57BL/6, enquanto que a SnPP apresentou um efeito oposto (Fig. 4A-B). O tratamento com CoPP também provocou a redução da carga parasitária quando infectamos a linhagem monocítica humana, THP-1 (Fig 4F). Posteriormente, iremos avaliar em macrófagos humanos se os efeitos tanto de CoPP e SnPP tem efeito semelhante que em macrófagos murinos.

Decidimos avaliar se os efeitos da CoPP foram de fato provocados pela indução de HO-1. O tratamento concomitante com CoPP e SnPP (50 μ M, cada) reverteu os efeitos de restringir a replicação de amastigotas e de diminuir a percentagem de macrófagos de C57BL/6 infectados tratados com CoPP (Fig 4C-D). Os produtos de degradação da HO-1 (biliverdina e bilirrubina) diminuiram significativamente a carga parasitária *in vitro* (Fig. 4E). Em experimento preliminar, a transfecção de células THP-1 aderentes com o plasmídeo contendo o gene *Hmox1* diminuiu a carga parasitária em células infectadas de modo semelhante ao observado com o tratamento de células THP-1 não transfectadas tratadas com CoPP (50 μ M) (Figura 4F). Esses dados sugerem que a indução de HO-1 está associada aos efeitos tripanocidas promovidos pela CoPP. Porém a CoPP e a SnPP não apresentam apenas efeito de induzir ou inibir a atividade da HO-1. Estas porfirinas afetam outras enzimas como a guanilato ciclase e também apresentar diversos outros efeitos inespecíficos (Grundemar & Ny, 1997; Mashreghi et al., 2008). Posteriormente, utilizaremos abordagens complementares para demonstrar se os efeitos tripanocidas da CoPP devem-se realmente à indução farmacológica de HO-1, através do uso de macrófagos de camundongos *Hmox1* *-/-* e *Nrf2* *-/-*.

A ação tripanocida da CoPP poderia estar associada ao seu efeito tóxico direto no parasita. Incubando por até 48h as formas tripomastigotas de *T. cruzi* com as metaloporfirinas (CoPP e SnPP), não observamos perda de viabilidade significativa (Fig 5). Esse conjunto de resultados sugerem que a CoPP e a SnPP atuam modulando a atividade biológica de macrófagos restringido ou aumento a replicação de amastigotas em células infectadas.

Esses efeito na diminuição da parasitemia e do parasitismo tissular em camundongos infectados e na carga parasitária de macrófagos infectados pelo tratamento com CoPP pode se dever à uma diminuição do estresse oxidativo, à um efeito citoprotetor ou ainda à modulação da resposta imune em macrófagos e tecidos infectados.

O óxido nítrico tem sido descrito como o mais importante mecanismo microbicida no controle da infecção por *T. cruzi* (Vespa, Cunha & Silva, 1994; Michailowsky et al., 2001). Tanto *ex vivo* como *in vitro* houve uma diminuição significativa na secreção de NO quando macrófagos ou camundongos infectados foram tratados com CoPP, mesmo quando estimulados com LPS, conhecido indutor de óxido nítrico (Fig. 6A-B). Esse efeito de diminuição tanto *in vitro* quando *ex vivo* da secreção de NO promovido pelo tratamento com CoPP pode estar relacionado com o aumento da expressão de HO-1, uma vez que a HO-1 modula negativamente a expressão de iNOS em macrófagos (Ashino et al., 2008). A diminuição da secreção de NO *ex vivo* de células peritoneais de animais tratados com SnPP pode estar relacionado a uma desativação de tais células por corpos apoptóticos, uma vez que a SnPP aumenta a apoptose de células T no baço de animais infectados (Fig. 10B) e a apoptose durante a infecção por *T. cruzi* pode levar a uma desativação de macrófagos e aumento da replicação intracelular do parasita (de Freitas et al., 2001)

Utilizamos também uma abordagem de deleção genética de secreção de NO com emprego camundongos deficientes geneticamente da óxido nítrico sintase (iNOS -/-). *In vitro*, macrófagos iNOS -/- apresentaram um comportamento semelhante no parasitismo com tratamento com as metaloporfirinas (Fig. 6C) quando comparados a macrófagos de C57BL/6 selvagens (Fig. 4C), com o tratamento da CoPP diminuindo e da SnPP aumentando a carga parasitária. *In vivo*, o tratamento da CoPP diminuiu a parasitemia em camundongos iNOS -/- de maneira semelhante em relação a iNOS +/+ (Fig. 6D). Camundongos iNOS -/- tratados com SnPP, entretanto, apresentaram, uma parasitemia inicial muito acentuada, sucumbindo precocemente à infecção. Nossos resultados, em um primeiro momento, confirmam achados de Cummings & Tarleton (2004) do papel do óxido nítrico como não sendo essencial no controle da parasitemia na infecção por *T. cruzi*. Entretanto, as cepas utilizadas nesse trabalho são a Brazil e a

Tulauhen, que apresentam efeitos diferentes em modelos experimentais quando se utiliza outras cepas de *T. cruzi*, como a Y que foi empregada na presente tese. Esse conjunto de resultados indicam que tanto *in vitro* como *in vivo* o efeito tripanocida da CoPP é independente de secreção de NO.

Apesar da importância de NO como mecanismo microbicida na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, o NO também pode induzir imunossupressão nessa fase da infecção (Abrahamsohn & Coffmann, 1995). Tratamentos *in vitro* que levam à diminuição da produção de NO como tratamentos com anticorpos monoclonais anti-TNF ou com inibidor da enzima iNOS foram capazes de restaurar parcialmente a resposta proliferativa de esplenócitos de animais infectados quando reestimulados com mitógenos (Martins et al., 1998). O efeito imunossupressor do NO foi demonstrado também em outras infecções por protozoários como *T. brucei* (Sternberg & McGuidan, 1992), *Toxoplasma gondii* (Candolfi et al., 1995) e *Plasmodium vinkei* (Rockett et al., 1994), e por bactérias como *Listeria monocytogenes* (Gregory et al., 1993), como também em modelo murino de sepse (Benjamin et al., 1994).

Embora os mecanismos que o NO exerça essa função imunossupressora não estejam bem claros, o NO poderia estar alterando o funcionamento de complexos enzimáticos importantes para o metabolismo celular (Granger & Lehinger et al., 1982; Kilbourn et al., 1992). inibir a duplicação de DNA (Lepoivre et al., 1990) ou causar danos diretos no DNA (Nguyen et al., 1992), sugerindo que o NO não só pode inibir a replicação, mas também induzir morte celular. O tratamento com CoPP poderia estar atuando diminuindo esses possíveis efeitos imunossupressores induzidos pelo NO, através de sua atividade citoprotetora.

TNF é um outro mediador inflamatório importante na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Santos Lima et al., 1997). O tratamento com CoPP ou SnPP em camundongos infectados não interferiu na secreção de TNF de células peritoneais aderentes reestimuladas com LPS *ex vivo* (Fig. 7A). *In vitro* também não foi observada uma diferença na secreção de TNF de macrófagos infectados tratados com CoPP e SnPP (Fig. 7B). Utilizamos também camundongos deficientes geneticamente da subunidade do receptor R1 de TNF (TNFR1 $-/-$). Em camundongos TNFR1 $-/-$, o tratamento com CoPP diminuiu a parasitemia *in vivo* e *in vitro* diminuiu a carga parasitária de

macrófagos infectados (Fig 7C-D). O tratamento com SnPP, além de não alterar a secreção de TNF, não exacerbou a carga parasitária *in vitro* de macrófagos TNFR1 *-/-*, como foi observado *in vitro* em macrófagos iNOS *-/-* (Fig, 6C).

Uma possível explicação para não ter havido uma exacerbação da infecção pelo tratamento com SnPP *in vitro* de macrófagos TNFR1 *-/-* seja a dependência de TNF nos efeitos deletérios desencadeados pela SnPP. Embora TNF tenha papel importante no controle da infecção por *T. cruzi* evidenciado tanto *in vitro* (Black et al., 1989; Muñoz et al., 1992; Costa et al, 2006) como *in vivo* (Santos Lima, et al, 1997), sua ação na resposta inata é complexa, podendo levar também a efeitos deletérios. A injeção de TNF exacerba a mortalidade de animais infectados apesar de induzir um aumento na atividade microbicida *in vitro* (Black et al., 1989). TNF está envolvido no estresse oxidativo associado a anemia em camundongos infectados por *T. cruzi* (Malvezi et al., 2004). A diminuição da infecção pelo tratamento com CoPP poderia estar associado tanto a uma atenuação do estresse oxidativo quanto a redução da inflamação desencadeada pelo produção de TNF na infecção pelo *T. cruzi*. De fato, o tratamento com CoPP atenua a inflamação pulmonar induzida por TNF (Lee et al., 2009). Esse conjunto de resultados indica que a secreção de TNF não participa dos efeitos tripanocidas promovidos pelo tratamento com CoPP.

O estresse oxidativo tem sido relacionado com o desenvolvimento da doença de Chagas e de outras tripanossomíases (Saleh et al, 2009; Igbokwe et al, 1994; Gupta 2009). A CoPP e SnPP apresentam papel de alterar o estado redox de células e tecidos via HO-1. Avaliamos o papel dessas metaloporfirinas utilizando drogas moduladoras do estado redox celular (paraquat e NAC) e macrófagos de camundongos geneticamente deficientes da subunidade gp91 phox do complexo da NADPH oxidase (gp91 phox *-/-*). O tratamento com NAC diminuiu tanto a carga parasitária de macrófagos infectados como também de macrófagos infectados tratados com SnPP (Fig. 8A). O tratamento de macrófagos gp91 phox *-/-* infectados com CoPP não alterou a carga parasitária, porém inibe quase que totalmente a carga parasitária de macrófagos gp91 phox *-/-* quando tratados com SnPP (Fig. 8B). O paraquat (droga indutora de estresse oxidativo) reverteu a diminuição da carga parasitária de macrófagos infectados tratados com CoPP (Fig. 8C).

Esses resultados sugerem a participação da CoPP e SnPP modulando o estado redox celular. De fato, avaliamos, por citometria de fluxo, o estresse oxidativo através da quantificação de ROS intracelular, e observamos que a infecção por *T. cruzi*, gera ROS intracelular e este efeito é revertido por NAC e pelos produtos de degradação da HO-1 (biliverdina e bilirrubina) (dados não mostrados). O efeito antioxidante do tratamento com CoPP poderia estar associado com seu efeito tripanocida através da modulação de moléculas e receptores de superfícies de membrana, como também alterando vias de sinalização celular que culminam na ativação celular contra *T. cruzi*. Por exemplo, o estresse oxidativo resultante do estímulo com peróxido de hidrogênio na linhagem celular Huh-7 inibe a expressão gênica antiviral bloqueando a sinalização celular induzida por IFN- α (Di Bona et al., 2006). A própria infecção intracelular pelo *T. cruzi*, modula negativamente a expressão de MHC de classe I através da geração de ROS em duas linhagens macrófagicas murinas (J774 e B10R) (Bergeron et al., 2008).

A degradação ou modificação de hemeoproteínas por oxidação pode levar à liberação de ferro e, este catalisado pela reação de Fenton, resultando em formação de radicais hidroxila (Rush e Koppenol, 1986). Macrófagos tratados com heme tiveram uma diminuição na carga parasitária (Fig 8C), porém o tratamento com heme reverteu parcialmente a redução promovida por CoPP. O heme também é capaz de induzir HO-1 assim como CoPP, porém, também é capaz de induzir estresse oxidativo e ativar macrófagos e neutrófilos (Graça-Souza et al., 2002; Jaeschke, 2003; Arruda et al., 2004; Figueiredo et al., 2007; Porto et al., 2007). Utilizando sulfato ferroso cujo estado de oxidação é 2+, observamos um efeito semelhante no aumento da carga parasitária no tratamento conjunto com CoPP (Fig 8C). Não pode ser excluído, entretanto, o efeito nutricional do ferro para o crescimento intracelular da forma amastigota, uma vez que a HO-1 degrada heme, diminuindo quantidades intracelulares de heme (Ryter; Alam & Choi, 2006). Uma dieta pobre em ferro ou o tratamento *in vivo* com desferrioxamina diminui a parasitemia em camundongos infectados com *T. cruzi* (Lalond & Holbein, 1984; Arantes et al, 2007). Fato semelhante foi observado *in vitro* em macrófagos infectados (Loo & Lalonde, 1984). Iremos posteriormente avaliar se, *in vivo*, o efeito antioxidante do tratamento com CoPP é responsável pela diminuição da parasitemia, através da injeção de drogas indutoras de estresse oxidativo, uma vez que Guevara et

al. (2000) tratando com NAC camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* observaram uma diminuição na parasitemia e na esplenomegalia.

Avaliamos também o envolvimento de IFN I como um dos responsáveis pelos efeitos tripanocidas do tratamento com CoPP, uma vez que a HO-1 (enzima induzida pela CoPP) em células mielóides é indispensável à expressão de IFN- β induzida por alguns estímulos conhecidos (Tziman et al., 2009) e a secreção de IFN I é importante mecanismo de defesa na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Costa et al., 1996; Koga et al., 2006). *In vitro*, utilizando macrófagos de camundongos deficientes do receptor de IFN I (IFNAR $-/-$), o tratamento com CoPP, biliverdina ou bilirrubina apenas reduziu parcialmente a carga parasitária (Fig. 9A). Por causa dessa redução parcial, avaliamos o envolvimento de PKR, como uma das moléculas efetoras da via de IFN I através de um inibidor seletivo, a 2-aminopurina (2-AP). Não houve diferença no tratamento com 2-AP concomitante com CoPP (Fig. 9B). *In vitro*, em macrófagos de C57BL/6, avaliamos a expressão de *ifnb* e IRF3 (Fig. 9C-D). Entretanto, não observamos aumento de IFN- β , muito pelo contrário, houve uma diminuição da sua expressão com tratamento com CoPP em macrófagos infectados, e não houve uma diferença na fosforilação de IRF3. Dados semelhantes aos nossos foram obtidos em células dendríticas que tiveram os níveis de fosforilação de IRF3 e de expressão de IFN- β diminuídos quando estimulados com CoPP ou CO (Rémy et al, 2009).

In vivo, o tratamento com CoPP diminuiu de maneira semelhante a parasitemia de camundongos IFNAR $-/-$ quando comparado com camundongos selvagens. Esses dados sugerem que embora *in vitro* ocorra uma reversão parcial, *in vivo* isso não acontece (Figura 9E). Isso pode dever-se à diferença de expressão entre os IFN I, pois embora os IFN- α e IFN- β exerçam atividades semelhantes, o controle de sua expressão é diferenciado pela presença de elementos regulatórios em seus promotores. Enquanto na região promotora de IFN- β , após infecções virais, é formado um “enhanceossoma” pela reunião dos fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 (Proteína ativadora-1) e IRFs (Fatores de transcrição de Interferon), o promotor de IFN- α possui apenas sítios de ligação para membros da família IRF. Por exemplo, o tratamento de biliverdina aumenta a secreção de IFN- α e também a expressão de moléculas efetoras da via de IFN I em células infectadas com HCV (Lehmann et al., 2010).

A infecção aguda por *T. cruzi* tem como característica promover o aumento do baço (esplenomegalia), indicando a ativação policlonal de esplenócitos, processo que precede a apoptose de linfócitos T (Minoprio et al., 1986). O tratamento com CoPP diminuiu significativamente a quantidade de esplenócitos (Fig. 10A) e o tamanho do baço dos animais infectados (dados não mostrados). Isso poderia ser atribuído a uma atividade anti-proliferativa já que a CoPP previne a proliferação em diversos tipos celulares (Gozzelino, Jeney & Soares, 2010). Entretanto, não houve diferença significativa na percentagem de linfócitos T CD4 e apenas parcial redução em linfócitos T CD8 quando os animais infectados são tratados com CoPP. O tratamento com SnPP não alterou a celularidade no baço de animais infectados, contudo, exacerbou a percentagem de linfócitos T CD4 e CD8 em apoptose (Fig. 10B). O aumento de apoptose promovido pelo tratamento com SnPP poderia explicar o aumento de parasitemia observado anteriormente por essa metaloporfirina (Fig. 3A), já que a apoptose durante a infecção por *T. cruzi* pode levar a uma desativação de macrófagos e aumento da replicação intracelular do parasita (de Freitas et al., 2001).

Quando avaliamos o efeito da CoPP na resposta mediada por linfócitos, não encontramos diferenças no perfil de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17) de esplenócitos de animais C57BL/6 infectados em relação a camundongos não tratados (Fig. 11A-D). Só o tratamento com SnPP aumentou significativamente a secreção de IL-10 em esplenócitos reestimulados *ex vivo* com mitógeno (anti-CD3) (Fig. 11D). A parasitemia aumentada em camundongos C57BL/6 poderia ser explicada em parte pelo aumento de secreção de IL-10, uma vez que tal citocina inibe *in vitro* a produção de NO e atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por IFN- γ . (Silva, Twardzik & Reed, 1991; Silva et al. 1992). Camundongos IL-10 $-/-$ são capazes de controlar melhor a infecção por *T. cruzi* (Hunter et al., 1997).

Infecções por patógenos intracelulares são em geral melhor controladas por uma resposta imune do tipo Th1 (Louis et al., 1998; Locksley et al., 1998; Denkers & Gazzinelli; 1998; Hartmann & Plum; 1999). A importância de linfócitos T CD8 no controle da infecção por *T. cruzi* é evidenciado através da depleção de linfócitos T CD8 por deleção genética e de neutralização por anticorpos anti-CD8 (Tarleton, 1990; Tarleton et al., 1992; Rottenberg et al., 1993). Em ambos os casos, os camundongos

tornam-se mais susceptíveis a infecções não letais por *T. cruzi* e morrem ainda na fase aguda. Linfócitos T CD8 podem controlar infecções por uma série de mecanismos, como secreção de IFN- γ que induz aumento da atividade microbicida de células infectadas, atividade de lise celular via perforina/granzimas e pela via de Fas/Fas ligante.

O tratamento com CoPP diminuiu a parasitemia e aumentou a sobrevivência de animais deficientes geneticamente de IFN- γ , perforina (PKO -/-) e de linfócitos T CD8 (CD8 -/-) (Fig.13-15). O tratamento com CoPP não alterou a percentagem de linfócitos T CD8 e nem de CD8 ativados (CD8CD69 high) (Fig. 12). Embora o tratamento com CoPP tenha diminuído a parasitemia e aumentado a sobrevivência de camundongos IFN- γ significativamente (Fig. 15B), os camundongos PKO -/- e CD8 -/- tiveram uma sobrevivência mais acentuada (Fig.14B, 15B). Isso se deve em parte aos diversos efeitos que o IFN- γ apresenta como aumento da atividade microbicida de macrófagos através da produção de ROS e RNI, desenvolvimento de resposta th1 antígeno-específica e de regulação da migração leucocitária (Schroder et al., 2004). Esses dados sugerem que os efeitos tripanocidas do tratamento com CoPP não atuam na resposta imune de linfócitos T CD8.

Desde a descoberta da doença de Chagas, apenas duas drogas são usadas no seu tratamento: nifurtimox e benzonidazole. Ambas são drogas nitro-heterocíclicas e são ativas na fase aguda da infecção, porém com efeito limitado na fase crônica da doença de Chagas (Rassi, 1982). As principais limitações dessas drogas são a necessidade de tratamento longo e o desenvolvimento de inúmeros efeitos colaterais como: dermatopatia, polineuropatia, perturbações no trato digestório como náuseas, vômito, perda de peso e aumento de dano genético espontâneo (Coura, 1996; Cançado, 1997; Gorla et al, 1989).

Independente de qual seja o mecanismo tripanocida da CoPP, seu uso como droga farmacológica poderia ser empregado como alternativa às drogas comumente usadas no tratamento da doença de Chagas, uma vez que, na presente tese, o emprego da CoPP diminuiu a infecção por *T. cruzi* tanto *in vitro* quanto *in vivo*, inclusive em várias linhagens de camundongos geneticamente susceptíveis ou não (C57BL/6, iNOS -/-, TNF R1 -/-, IFNAR -/-, IFN- γ -/-, CD8 -/- e PKO -/-). Estudos posteriores serão

realizados para avaliar a eficácia do tratamento com CoPP na fase crônica em modelo murino na infecção por *T. cruzi* e avaliar sua eficácia e efeitos adversos como fármaco em ensaios de triagem clínica em humanos.

CONCLUSÕES

- 1 O tratamento de CoPP, em camundongos C57BL/6, diminui a infecção aguda por *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, enquanto que o tratamento com SnPP aumenta;
- 2 Os efeitos microbicidas do tratamento de CoPP independem de TNF e NO *in vivo* e *in vitro*;
- 3 O tratamento de CoPP diminui a celularidade, porém não interfere na apoptose de linfócitos T CD4 e apenas reduz parcialmente de T CD8 no baço de camundongos infectados 9 dpi;
- 4 O tratamento de CoPP não alterou o perfil de citocinas (IFN- γ , IL-17 e IL-10) em esplenócitos re-estimulados *ex-vivo*;
- 5 Os efeitos microbicidas de CoPP são parcialmente dependentes de atividade anti-oxidante *in vitro* e drogas moduladores de estresse oxidativo (NAC e apocinina) diminuem a carga parasitária *in vitro*.
- 6 Os efeitos microbicidas de CoPP são parcialmente dependentes *in vitro* de IFNAR, porém independem *in vivo*.
- 7 O tratamento de CoPP diminuiu a parasitemia e aumentou a sobrevivência de camundongos CD8 $-/-$, PKO $-/-$ e IFN- γ $-/-$.
- 8 As metaloporfirinas (CoPP e SnPP) não apresentaram efeito tóxico direto em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, L. C.; Rizzo, L. V.; Ianni, B.; Albuquerque, F.; Bacal, F.; Carrara, D.; Bocchi, E. A.; Teixeira, H. C.; Mady, C.; Kalil, J. & Cunha-Neto, E. **Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to Trypanosoma cruzi infection.** J Autoimmun. 17: 99-107. 2001.
- Abrahamssohn, I. & Coffman, R. L. **Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection.** Exp Parasitol, 84: 231-244. 1996.
- Abrahamssohn, I. A. & Coffman R. L. **Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in Trypanosoma cruzi infection.** Journal of Immunology. 155: 3955-3963. 1995.
- Alam, J.; Cai, J. & Smith, A. **Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals.** J. Biol. Chem. 269: 1001-1009.1994.
- Alam, J.; Camhi, S, & Choi, A. M. **Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer.** J. Biol. Chem. 270: 11977-11984. 1995.
- Alam, J.; Stewart, D.; Touchard, C.; Boinapally, S.; Choi, A. M. & Cook, J. L. **Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene.** J. Biol. Chem. 274: 26071-26078.1999.
- Aliberti, J. C. S.; Cardoso, M. A. A. G.; Maritns, G. A.; Gazzinelli, R. T.; Vieira, L.Q. & Silva, J.S. **Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes.** Infect Immun. 64: 1961-1967. 1996.
- Arantes, J. M.; Pedrosa, M. L.; Martins, H.R.; Veloso, V. M.; de Lana, M.; Bahia, M.T.; Tafuri, W.L. & Carneiro, C. M. **Trypanosoma cruzi: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice.** Exp Parasitol. 117(1):43-50. 2007.
- Araújo-Jorge, T. C. & Castro, S. L. **Doença de Chagas: manual para experimentação animal.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 368p. 2000.
- Arruda, M. A.; Rossi, A. G.; de Freitas, M. S.; Barja-Fidalgo, C. & Graça-Souza, A. V. **Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB.** J Immunol.173(3):2023-30. 2004.
- Ashino, T.; Yamanaka, R.; Yamanoto, M.; Shimokawa, H.; Sekikawa, K.; Iwakura, Y.; Shioda, S.; Numazawa, S. & Yoshida,T. **Negative feedback regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by heme oxygenase-1 induction in macrophages.** Molecular Immunology. 45: 3106-2115. 2008.
- Bach, F. H. **Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel.** FASEB J. 19(10):1216-9. 2005.
- Bafica, A.; Santiago H. C.; Goldszmid, R.; Ropert, C.; Gazzinelli, R. T.; & Sher, A. **Cutting edge:TLR9 ad TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection.** J Immunol. 177: 3515-3519. 2006.
- Beltz, L. A.; Szein, M. B. & Kierszenbaum, F. **Novel mechanism for Trypanosoma cruzi-induced suppression of human lymphocytes: inhibition of IL-2 receptor expression.** J Immunol. 141: 289-294. 1988.

- Benjamim, C. F.; Silva, J. S.; Fortes, Z. B.; Oliveira, M. A.; Ferreira, S. H. & Cunha, F. Q. **Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils.** *Infect Immun.*70(7):3602-10. 2002.
- Bergeron, M.; Blanchette, J. Rouleau, P. & Olivier, M. **Abnormal IFN- γ -dependent immunoproteasome modulation by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages.** *Parasite Immunology.* 30: 280-292. 2008.
- Black, C. M.; Israelski, D. M.; Suzuki, Y. & Remington, J. S. **Effect of recombinant tumor necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*.** *Immunology.* 68: 570-574. 1989.
- Bona, D. D.; Cippitelli, M.; Fionda, C.; Cammà, C.; Licata, A.; Santoni, A. & Craxì, A. **Oxidative stress inhibits IFN- α -induced antiviral gene expression by blocking the JAK-STAT pathway.** *Journal of Hepatology.* 45: 271-279. 2006.
- Brener Z. & Gazzinelli R. **Immunological control of *Trypanosoma cruzi* and pathogenesis of Chagas disease.** *Intern. Arch. Allergy Immunol.* 114: 103-110. 1997.
- Campos, M. A.; Closel, M.; Valente, E. P.; Cardoso, J. E.; Alkira, S.; Alvarez-Leite, J. I.; Ropert, C.; & Gazzinelli, R. T. **Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88.** *J Immunol.* 172: 1711-1718. 2004.
- Campos, M. A.; Almeida, I. C.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Valente, E. P.; Procópio, D. O.; Travassos, L.R.; Smith, J. A.; Golenbock, D. T. & Gazzinelli, R. T. **Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite.**
- Cançado, J. R. **Terapêutica específica.** In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 323-351. 1997.
- Candolfi, E.; Hunter, C. A. & Remington, J. S. **Roles of IFN- γ and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis.** *Infection & Immunity.* 63: 751-756. 1995.
- Carrasco Guerra, H. A.; Palacios-Prü, E.; Dagert de Scorza, C.; Molina, C.; Inglessis, G. & Mendoza, R. V. **Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage.** *American Heart Journal.* 113: 716-724. 1987.
- Chauveau, C.; Remy, S.; Royer, P. J.; Tanguy-Royer, S.; Hubert, F. X. Teson, L. Brion, R.; Biriou, G.; Gregoire, M. **Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression.** *Blood.* 106: 1694-1702. 2005.
- Chen, K & Maines, M. D. **Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38.** *Cell Mol Biol.* 46: 609-617.2000.
- Chen, Y. H.; Lin, M. W.; Tsai, H. L.; Kuo, S. S.; Chen, J. W.; Charng, M. J.; Wu, T. C.; Chen, L. C. & Ding Y. A. **Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients** *Hum Genet.* 111: 1-8. 2002.
- Chora A.A.; Fontoura, P., Cunha, A.; Pais, T. F.; Cardoso, S.; Ho, P. P.; Lee L. Y.; Sobel, R.A.; Steinman, L & Soares, M. P. **Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation.** *J Clin Invest.*;117(2):438-47. 2007.

- Chung SW, Liu X, Macias AA, Baron RM, Perrella MA. **Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice.** *J Clin Invest.* 118(1):239-47. 2008.
- Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. **Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278(2):H643-51. 2000.
- Costa, V.M., Torres, K.C., Mendonça, R.Z., Gresser, I., Gollob, K.J., Abrahamsohn I.A. **Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to Trypanosoma cruzi infection.** *J Immunol.* 1;177(5):3193-200. 2006
- Coura, J. R. **Current prospects of specific treatment of Chagas disease.** *Bolletín Chileno Parasitology.* 51: 69-75.1996.
- Cummings K. L. & Tarleton R. L. **Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of Trypanosoma cruzi infection in mice.** *Infect Immun.*72(7):4081-9. 2004.
- Cunha Neto, E.; Bilate, A. M.; Hyland, K. V.; Fonseca, S. G.; Kalil, J. & Engman, D. M. **Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry.** *Autoimmunity.* 39: 41-54. 2006.
- Cunha-Neto, E.; Dzau, V. J.; Allen, P. D.; Stamatidou, D.; Benvenutti, L.; Higuchi, M. L. Koyama, N. S.; Silva, J. S.; Kalil, J. & Liew, C. C. **Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy .** *Am J Pathol.* 167: 305-313. 2005.
- Cunha-Neto, E.; Iwai, L. K.; Bilate, A. M. B.; Fonseca, S. G. & Kali, J. **Autoimmunity in Chagas' Disease.** In: Shoenfeld, Y. Rose, N. R. eds. *Infection and Autoimmunity.* Amsterdam, The Netherlands. Elsevier. 167: 449-472. 2004.
- de Oliveira, T. B.; Pedrosa, R. C. & Filho, D. W. **Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease.** *International Journal of Cardiology.* 116: 357-363. 2007.
- Dennerly, P. A.; Visner, G. Weng, Y. H.; Nguyen, X.; Lu, F.; Zander, D. & Yang, G. **Resistance to hyperoxia with heme oxygenase-1 disruption: role of iron** *Free Radical Biol. Med.* 34: 124-133. 2003.
- Devadas K, Dhawan S. **Hemin activation ameliorates HIV-1 infection via heme oxygenase-1 induction.** *J Immunol.* 176(7):4252-7. 2006.
- Dhalla, N. S. ; Elmoselhi, A. B. ; Hata, T. & Makino, N. **Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury,** *Cardiovascular Research.* 47: 446-456. 2000.
- Drigo, S.A., Cunha-Neto, E., Ianni, B., Cardoso, M.R., Braga, P. E., Fae, K. C., Nunes, V. L., Buck, P., Mady, C., Kalil, J., Goldberg, A. C. **TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients.** *Microbes Infect.* 8(3):598-603. 2006.
- Fenton, H.J.H. **Oxidation of tartaric acid in presence of iron.** *J. Chem. Soc. (Lond.)* 65: 899–910. 1894.
- Figueiredo, R. T; Fernandez, P. L.; Mourão-Sá, D. S.; Porto, B. N.; Dutra, F. F.; Alves, L. S.; Oliveira, M. F.; Oliveira, P. L.; Graça-Souza, A. V. & Bozza, M. T. **Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4.** *J Biol Chem.* 282(28):20221-9. 2007.
- Fondevila, C., Shen, X.D., Tsuchiyashi, S., Yamashita, K., Csizmadia, E., Lassman, C., Busuttill, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W., Bach, F.H. **Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury.** *Hepatology,* 40(6):1333-41. 2004

- Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ. **Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis.** Nat Med. 7(5):598-604. 2001.
- Gazzinelli, T. T.; Oswald, I. P.; Hieny, S.; James, S.L. & Sher, A. **The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin- 10 and transforming growth factor- β .** Eur J Immunol, 22: 2501-2506. 1992.
- Giordanengo, L., Maldonado, C., Rivarola, H.W., Iosa, D., Girones, N., Fresno, M., Gea, S. **Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring.** Eur J Immunol. 30(11):3181-9.2000.
- Gomes, J. A.; Bahia-Oliveira, L. M.; Rocha M. O.; Martins-Filho, O. A.; Gazzinelli, G. & Correa-Oliveira, R. **Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response.** Infect Immun. 71: 1185-1193. 2003.
- Gorla, N. B.; Ledesma, O. S.; Barbieri, G. & Larripa, I. B. **Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox.** Mutation research, 224: 263-267. 1989.
- Graça-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. **Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes.** Blood. 99(11):4160-5. 2002.
- Granger, D. A. & Lehninger A. L. **Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cell.** Journal of Cell Biology. 95: 527-335. 1982.
- Gregory, S. H.; Wing, E. J.; Hoffman, R. A.; Simmons R. L. **Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*.** Journal of Immunology. 150: 2901-2909. 1993.
- Grundemar L, Ny L. **Pitfalls using metalloporphyrins in carbon monoxide research.** Trends Pharmacol Sci. 18(6):193-5. 1997.
- Guevara AG, Guilvard E, Borges MM, Cordeiro da Silva A, Ouaisi A. **N-Acetylcysteine and glutathione modulate the behaviour of Trypanosoma cruzi experimental infection.** Immunol Lett. 71(2):79-83. 2000.
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. **Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice.** Hepatology.38(2):355-63. 2003.
- Gupta S, Bhatia V, Wen JJ, Wu Y, Huang MH, Garg NJ. **Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes.** Free Radic Biol Med.;47(10):1414-21. 2009.
- Haarel-Bellan, A.; Joskowiez, M.; Fradelize, D. & Eiesen, H. **T lymphocyte function during experimental Chagas disease: production of and response to interleukin 2.** Eur J Immunol. 140: 2769-2773, 1988.
- Higushi, M. L.; Bevenuto, L. A.; Reis, M. M.; Metzner, M. **Pathophysiology of the heart in Chagas disease current status and new developments.** Cardiovascular research; 60: 96-107. 2003.
- Hira, S.; Tomita, T.; Matsui, T.; Igarashi, K. & Ikeda-Saito, M. **Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure.** IUBMB Life. 59:542-51. 2007.

Hou, W.H.; Rossi, L.; Shan, Y.; Zheng, J.Y.; Lambrecht, R. W.; & Bonkovsky, H. L. **Iron increases HMOX1 and decreases hepatitis C viral expression in HCV- Expressing cells.** World J Gastroenterol. 36: 4499-4510. 2009.

Hunter, C. A.; Ellis-Neyes, L. A.; Slifer, T.; Kanaly, S.; Fort, M. Rennick, D. & Araújo, F. G. **IL-10 required to prevent immune hyperactivity during with *Trypanosoma cruzi*.** J Immunol. 158: 331-3316. 1997.

Igbokwe IO, Esievo KA, Saror DI, Obagaiye OK. **Increased susceptibility of erythrocytes to in vitro peroxidation in acute *Trypanosoma brucei* infection of mice.** Vet Parasitol. 55(4):279-86. 1994.

Immenschuh S, Ramadori G. **Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target.** Biochem Pharmacol. 15;60(8):1121-8. 2000

Ishikawa M, Numazawa S, Yoshida T. **Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1.** Free Radic Biol Med. 15;38(10):1344-52. 2005.

Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G. **Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme.** Blood. 100(3):879-87. 2002.

Kacimi, R.; Chentoufi, J; Honbo, N.; Long, C. S. & Karliner, J. S. **Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection.** Cardiovasc Res. 46: 139-150. 2000.

Kawamura K, Ishikawa K, Wada Y, Kimura S, Matsumoto H, Kohro T, Itabe H, Kodama T, Maruyama Y. **Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25(1):155-60. 2005.

Keyse SM, Tyrrell RM. **Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite.** Proc Natl Acad Sci U. S. A. 86(1):99-103. 1989

Kiemer AK, Bildner N, Weber NC, Vollmar AM. **Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells.** Endocrinology. 144(3):802-12. 2003

Kietzmann T, Samoylenko A, Immenschuh S. **Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes.** J Biol Chem. 16;278(20):17927-36. 2003

Kilbourn, R. G.; Klostergaard J & Lopez-Berstein, G . **Activated macrophages secrete a soluble factor that inhibits mitochondrial respiration of tumor cells.** Journal of Immunology. 133: 2577-2581. 1992.

Koga, R.; Hamano, S. Kuwata, H. Atarashi, K.; Ogawa, M.; Hisaede, H.; Yamanoto, M.; Alkira, S.; himero, K.; Matsumoto, M.. **TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*.** J Immunol. 177: 7059-7066. 2006.

Kruger AL, Peterson SJ, Schwartzman ML, Fusco H, McClung JA, Weiss M, Shenouda S, Goodman AI, Goligorsky MS, Kappas A, Abraham, NG. **Up-regulation of heme oxygenase provides vascular protection in an animal model of diabetes through its antioxidant and antiapoptotic effects.** J Pharmacol Exp Ther. 319(3):1144-52. 2006

Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. Toxicol Lett. 4;157(3):175-88. 2005

- Kushida T, Li Volti G, Quan S, Goodman A, Abraham NG. **Role of human heme oxygenase-1 in attenuating TNF-alpha-mediated inflammation injury in endothelial cells.** J Cell Biochem., 87(4):377-85. 2002.
- Kutty RK, Nagineni CN, Kutty G, Hooks JJ, Chader GJ, Wiggert B. **Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor-beta.** J Cell Physiol. 1994 May;159(2):371-8.
- Kwak JY, Takeshige K, Cheung BS, Minakami S. **Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system.** Biochim Biophys Acta., 15;1076(3):369-73. 1991.
- Lalonde RG, Holbein BE. **Role of iron in Trypanosoma cruzi infection of mice.** J Clin Invest. 73(2):470-6. 1984.
- Lauria-Pires, L., Teixeira, A.R. **Virulence and pathogenicity associated with diversity of Trypanosoma cruzi stocks and clones derived from Chagas' disease patients.** Am J Trop Med Hyg. 55(3):304-10. 1996
- Lee IT, Luo SF, Lee CW, Wang SW, Lin CC, Chang CC, Chen YL, Chau LY, Yang CM. **Overexpression of HO-1 protects against TNF-alpha-mediated airway inflammation by down-regulation of TNFR1-dependent oxidative stress.** Am J Pathol. 175(2):519-32. 2009.
- Lee, S. S.; Gao, W.; Mazzola, S.; Thomas, M. N.; Csizmadia, E.; Otterbein, L. E.; Basch, F. H. & Wang, H. **Hemeoxygenase-1, carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells.** FASEB J. 21: 3420-3457. 2007.
- Lehmann E, El-Tantawy WH, Ocker M, Bartenschlager R, Lohmann V, Hashemolhosseini S, Tiegs G, Sass G. **The heme oxygenase 1 product biliverdin interferes with hepatitis C virus replication by increasing antiviral interferon response.** Hepatology, 51(2):398-404. 2010
- Lepoivre, M.; Chenais, B.; Yapo, A; Lemaire, G.; Thelander, L. & Tenu, J. P. **Alterations of ribonucleotide reductase activity following of nitrite-generation pathway in adenocarcinoma cell.** Journal of Biological Chemistry. 265: 14143-14149. 1990.
- Lesnefsky, E. J.; Moghaddas, S.; Tandler, B.; Kerner, J. & Hoppel, C. L. **"Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure,"** Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 33: 1065-1089. 2001.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt}.** Methods 25, 402–408. 2001.
- Loo VG, Lalonde RG. **Role of iron in intracellular growth of Trypanosoma cruzi.** Infect Immun. 45(3):726-30. 1984.
- Lutton, J.D., Levere, R.D., Abraham, N.G. **Physiologic role of heme and cytochrome P-450 in hematopoietic cells.** Proc Soc Exp Biol Med. 196(3):260-9 1996.
- Maines, M. D. **The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 37:517-54. 1997.
- Maines, M. D; Ibrahim, N. G; Kappas, A. **Solubilization and partial purification of heme oxygenase from rat liver.** J Biol Chem. 252(16):5900-3. 1977.

- Majumder, S. & Keirszenbaum, F. **Mechanisms of *Trypanosoma cruzi*-induced downregulation of lymphocyte function: inhibition of transcription and expression of IL-2 receptor γ (p64 IL-2R) and β (p70IL-2R) chain molecules in activated normal human lymphocytes.** J Immunol. 141: 289-294. 1988.
- Malvezi, A. D; Cecchini, R.; de Souza, F.; Tadokoro, C. E.; Rizzo, L. V. & Pinge-Filho, P. **Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** FEMS Immunol Med Microbiol. 41(1):69-77. 2004.
- Marczin, N.; El-Habashi, N.; Hoare, G. S.; Bundy, R. E. & Yacoub, M. **Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms,** Archives of Biochemistry and Biophysics. 420: 222–236. 2003.
- Marin-Neto, J. A.; Simões, M. V.; Ayres-Neto, E. M. & et al. **Studies of the coronary circulation in Chagas' heart disease.** São Paulo Medical Journal. 113: 826-834. 1995.
- Martin D, Tarleton R. **Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection.** Immunol Rev. 201:304-17. 2004.
- Martins, G. A.; Cardoso, M. G. A.; Aliberti, J. C. S. & Silva, J. S. **Nitric oxide-induced apoptotic cells death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** Immunology Letters. 63: 113-120. 1998.
- Mashreghi MF, Klemz R, Knosalla IS, Gerstmayer B, Janssen U, Buelow R, Jozkowicz A, Dulak J, Volk HD, Kotsch K. **Inhibition of dendritic cell maturation and function is independent of heme oxygenase 1 but requires the activation of STAT3.** J Immunol. 180(12):7919-30. 2008.
- Masini E, Vannacci A, Marzocca C, Pierpaoli S, Giannini L, Fantappiè O, Mazzanti R, Mannaioni PF. **Heme oxygenase-1 and the ischemia-reperfusion injury in the rat heart.** Exp Biol Med (Maywood). 2003 May;228(5):546-9.
- Melo R.C., Machado C.R. ***Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats.** Exp Parasitol. 97(1):15-23. 2001.
- Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. **Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection.** Am J Pathol.159(5):1723-33. 2001.
- Ming M, Ewen ME, Pereira ME. ***Trypanosome* invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway.** Cell, 28;82(2):287-96. 1995
- Minoprio, P. M.; Eisen, H.; Forni, L.; D'Imperio Lima, M. R.; Joskowicz, M. & Coutinho, A. **Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I Quantitation of both T-and-B-cell responses.** Scandinavian Journal of Immunology. 24: 661-668. 1986.
- Minoprio, P.; Cheikh, M. C.; Murphy, E.; Hontebeyrrie-Joskowicz, M.; Coffmam, R.; Coutinho, A. & O'Garra, A. **Kid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN- γ dependent.** J Immunol. 151: 4200-4208. 1993.
- Minoprio, P.; Itohara, S.; Heusser, C; Tonegawa, S. & Coutinho, A. **Immunobiology of murine T. cruzi infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TcRI cells.** Immunol Rev. 112: 183-207. 1989.

- Moncayo A. **Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 98(5):577-91. 2003.
- Monteiro, A. C.; Schumitz, V.; Svensjo, E.; Gazzinelli, R. T.; Almeida, I. C.; Todorov, A.; de Arruda, L. B.; Torrecilhas, A. C.; Pesquero, J. B.; Marrot, A. & et al, A. **Cooperative activation of: TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by Trypanosoma cruzi.** J Immunol. 177: 6325-6335. 2006.
- Muñoz-Fernandez, M. A.; Fernandez, M. A. & Fresno, M. **Synergism between tumor necrosis factor α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intercellular Trypanosoma cruzi through a nitric oxide dependent mechanism.** Eu J Immunol. 22: 301-307. 1992.
- Nguyen, T.; Brunson, D.; Crespi, C. L.; Penman, B. W.; Wishinok, J. S. & Tannembaum, S. R. **DNA damage and mutation in human cell exposed to nitric oxide in vitro.** Proceedings of the National Academy of Science. 89: 3030-3034. 1992.
- Ogawa, K.; Sun, J.; Taketani, S.; Nakajima, O.; Nishitani, C. & et al. **Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1.** EMBO J. 20:2835-2843. 2001.
- Oliveira, J. S. M. **A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy,** *American Heart Journal.* 110: 1092-1098. 1985.
- Ortiz-Ortiz L, Ortega T, Capín R, Martínez T. **Enhanced mononuclear phagocytic activity during Trypanosoma cruzi infection in mice.** Int Arch Allergy Appl Immunol.50(2):232-42. 1976.
- Oswald, I.P.; Wynn, T. A.; Sher, A. & James, S. L. **Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a costimulatory factor for interferon- γ -induced activation.** Proc Natl Acad Sci USA. 89: 8676-8680.. 1992.
- Otterbein, L. E.; Bach, F. H.; Alam, J.; Soares, M.; Tao, L. H.; Wysk, M.; Davis, Flawell, R. A. & Choi, A. M. **Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the nitrogen-activated protein kinase pathway.** Nat Med. 6: 422-428. 2000.
- Otterbein, L. E.; Zuckerbraun, B. S.; Haga, M.; Liu, F.; Song, R.; Usheva, A.; Stachulak, C.; Bdyak, N.; Smith, N. R.; Csizmadia, E & Et al. **Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury.** Nat Med. 9: 183-190. 2003.
- Overhaus M, Moore BA, Barbato JE, Behrendt FF, Doering JG, Bauer AJ. **Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 290(4):G695-703. 2006.
- Palacios-Pru, E.; Carrasco, H.; Scorza, C. & Espinoza, R. **Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis,** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 41: 29-40. 1989.
- Parada, H.; Carrasco, H. A.; Añez, N.; Fuenmayor, C. & Inglessis, I. **Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study,** *International Journal of Cardiology.* 60: 49-54. 1997.
- Ponka, P. **Cell biology of heme.** *The American Journal of the Medical Sciences.* 318(4): 241-256. 1999.

- Porto, B. N.; Alves, L. S.; Fernández, P. L.; Dutra, T. P.; Figueiredo, R. T.; Graça-Souza, A. V & Bozza, M.T. **Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors.** J Biol Chem. 282(33):24430-6. 2007.
- Poss, K. D. & Tonegawa, S. **Heme oxygenase-1 is required for mammalian iron reutilization.** Proc. Natl Acad Sci USA. 94: 10919-10924.1997a.
- Poss, K. D. & Tonegawa, S. **Reduced stress defense in heme oxygenase-1 deficient cells.** Proc. Natl Acad Sci USA. 94: 10925-10930.1997b..
- Previato, J. O.; Gorin, P. A. J.; Mazurek, M.; Xavier, M. T.; Fournet, B.; Wieruszkes, J. M. & Mendonça-Previato, L. **Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of Trypanosoma cruzi .** J Biol Chem. 265: 2518-2526. 1997.
- Protzer U, Seyfried S, Quasdorff M, Sass G, Svorcova M, Webb D, Bohne F, Hösel M, Schirmacher P, Tiegs G. **Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection.** Gastroenterology. 133(4):1156-65. 2007
- Ramasawmy R, Faé KC, Cunha-Neto E, Borba SC, Ianni B, Mady C, Goldberg AC, Kalil J. **Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among Trypanosoma cruzi-infected individuals.** Mol Immunol. 45(1):283-8. 2008.
- Rassi, A. **Tratamento etiológico da doença de Chagas.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 38: 277-281. 1982.
- Reede, S. G. **Cytokine control of the macrophage parasites leishmaniasis, Trypanosoma cruzi.** Molecular Approaches to Parasitology. New York: Wiley-Liss Inc., 443-453. 1995.
- Rémy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer PJ, Motterlini R, Foresti R, Painchaut M, Pogu S, Gregoire M, Bach JM, Anegon I, Chauveau C. **Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity.** J Immunol. 15;182(4):1877-84. 2009.
- Rémy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer PJ, Motterlini R, Foresti R, Painchaut M, Pogu S, Gregoire M, Bach JM, Anegon I, Chauveau C. **Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity.** J Immunol.182(4):1877-84. 2009.
- Ribeirao, M.; Pereira-Chiocola, V. L.; Renia, L.; Augusto Fragata, F. A.; Schenkman S. & Rodrigues, M. M. **Chagasic patients develop a type 1 immune response to Trypanosoma cruzi trans-sialidase.** Parasite Immunol. 22: 49-53. 2000.
- Ribeiro-Dos-Santos R, Mengel JO, Postol E, Soares RA, Ferreira-Fernandez E, Soares MB, Pontes-De-Carvalho LC. **A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of Trypanosoma cruzi.** Parasite Immunol. 23(2):93-101. 2001.
- Rockett, K. A.; Awburn, M. M.; Rockett. E. J.; Cowden, W. B, & Clark, I. A. **Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression.** Parasite Immunology. 16: 243-249. 1994.
- Ropert, C. & Gazzinelli, R. T. **Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with Trypanosoma cruzi.** J Endotoxin Res. 10: 425-30. 2004.

- Rottenberg, M. E.; Castanos-Velez, E.; De Mesquita, R.; Laguardia, O. G.; Biberfeld, P. & Orn, A. **Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* inducible nitric oxide synthase (i NOS) evidence for dual pathway of iNOS induction.** Eur J Immunol. 26: 3203-3213. 1996.
- Rush JD, Koppenol WH. **Oxidizing intermediates in the reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide. Reactions with organic molecules and ferrocyclochrome c.** J Biol Chem. 261(15):6730-3. 1986.
- Russo, M.; Starbinas, N.; Ribeiro-dos-Santos, R; Minoprio, P.; Elisen, H. & Hontebeyrie-Joskowicz, M. **Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic of *Trypanosoma cruzi*.** Parasite Immunol. 11: 385-395. 1989.
- Ryter, S. W.; Alan, J. & Choi, A. M. K. **Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications.** Physiol Rev. 86: 583-650.2006.
- Saleh MA, Al-Salahy MB, Sanousi SA. **Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*.** Vet Parasitol.162(3-4):192-9. 2009.
- Sano K, Nakamura H, Matsuo T. **Mode of inhibitory action of bilirubin on protein kinase C.** Pediatr Res. 19(6):587-90. 1985.
- Santos Lima EC, Minoprio P. **Chagas' disease is attenuated in mice lacking gamma delta T cells.** Infect Immun. 64(1):215-21. 1996.
- Santos Lima, E. C.; Garcia, I.; Vicentelli, M. H.; Vassalli, P. & Minoprio, P. **Evidence for a proactive role of tumor necrosis in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** Infect Immun. 65: 457-465. 1997.
- Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M, Ollinger R, Choi AM, Otterbein LE. **Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 289(6):L1131-7. 2005.
- Schileifer, K. W & Mansfield, J. M. **Suppressor macrophages in Africa trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins.** Journal of Immunology. 151: 5492-5503. 1993.
- Sedlak TW, Snyder SH. **Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle.** Pediatrics. 113(6):1776-82. 2004.
- Sedlak, T. W.; Saleh, M.; Higginson, D. S.; Paul, B. D.; Juluri, K.R. & Snyder, S. H. **Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles.** PNAS. 106: 5171-5176. 2009.
- Shan Y, Zheng J, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. **Reciprocal effects of micro-RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes.** Gastroenterology. 133(4):1166-74. 2007.
- Shibahara S, Müller RM, Taguchi H. **Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock.** J Biol Chem. 262(27):12889-92. 2007.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. **Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** J Exp Med.175(1):169-74. 1992.
- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. **Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta).** J Exp Med. 174(3):539-45. 1991.

- Silva, G. K.; Gutierrez, F. R. S.; Guedes, P. M. M.; Horta, C. V.; Cunha, L. D.; Mineo, T. W.P.; Santiago-Silva, J.; Kobayashi, K. S.; Flavell, R. A.; Silva, J. S. & Zamboni, D. S. **Cutting Edge: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Responses Account for Murine Resistance against *Trypanosoma cruzi* infection.** The Journal of Immunology. 184: 000-000. 2009.
- Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, Hoffman RA, Seol DW, Flavell RA, Billiar TR, Otterbein LE, Choi AM. **Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway.** J Immunol. 2004 Jan 15;172(2):1220-6.
- Sternberg, J. & Mcguidan, F. **Nitric oxide mediates suppression of T cell responses in murine *Trypanosoma brucei* infection.** European Journal of Immunology. 22: 2741-2744. 1992.
- Stocker R, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. **Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin.** Methods Enzymol. 1990;186:301-9. 1990.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. **Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance.** Science. 235(4792):1043-6. 1987.
- Stout DL, Becker FF. **Heme enzyme patterns in genetically and chemically induced mouse liver tumors.** Cancer Res.,46(6):2756-9. 1986.
- Sun, J.; Hoshino, H.; Takaku, K.; Nakajima, O.; Muto, A. & et al. **Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene.** EMBO J. 21: 5216-5224. 2002.
- Tambourgi D.V.; Kipnis T. L.; Dias da Silva, W. ***Trypanosoma cruzi*: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow derived mast cells and by mastocytoma cells.** Exp. Parasitol; 68: 192-201. 1989.
- Tarleton, R. L. ***Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL2 production. II. Evidence for a role for suppressors cells.** J Immunol. 140: 2769-2773. 1988.
- Tarleton, R. L. **Tumor necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease.** Clin Exp Immunol. 73: 186-190. 1988.
- Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS **Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection.** Trends Parasitol. 18(6):262-5. 2002.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. **Microsomal heme oxygenase: Characterization of the enzyme.** J Biol Chem. 1969 Dec 10;244(23):6388-94. 1969.
- Tenhunen R, Ross ME, Marver HS, Schmid R. **Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization.** Biochemistry, 20;9(2):298-303. 1970
- Tenhunen, R.; Marvel, H. S. & Schmid, R. **The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase.** Proc Natl Acad Sei USA. 61: 478-755. 1968.
- Tiroch K, Koch W, von Beckerath N, Kastrati A, Schömig A. **Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and restenosis following coronary stenting.** Eur Heart J., 28(8):968-73. 2007
- Tracz MJ, Juncos JP, Croatt AJ, Ackerman AW, Grande JP, Knutson KL, Kane GC, Terzic A, Griffin MD, Nath KA. **Deficiency of heme oxygenase-1 impairs renal hemodynamics and exaggerates systemic inflammatory responses to renal ischemia.** Kidney Int. 72(9):1073-80. 2007.

- Tzima S, Victoratos P, Kranidioti K, Alexiou M, Kollias G. **Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production.** J Exp Med.,206(5):1167-79. 2009.
- Ue C, Andersson J, Orn A. **Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with Trypanosoma cruzi.** Clin Exp Immunol., 134(2):195-201. 2003.
- Uyemura SA, Jordani MC, Polizello AC, Curti C. **Heart FoF1-ATPase changes during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in rats.** Mol Cell Biochem. 165(2):127-33. 1996
- Uyemura, S. A.; Jordani, M. C. .; Polizello, A. C. M. & Curti, C. **Heart FoF1-ATPase changes during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in rats.** Molecular and Cellular Biochemistry. 165: 127-133. 1996.
- Van Voorhis WC. **Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with Trypanosoma cruzi leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production.** J Immunol.148(1):239-48. 1992
- Vespa, G. N. R.; Cunha, F. Q. & Silva. J. S. **Nitric oxide involved in control of trypanosome cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro.** Infection & of Immunity. 62: 5177-5182. 1994.
- Wagener, F. D. T. G.; Eggert, A.; Boeman, O. C.; Oyen, W. J. G.; Verhofstad, A.; Abraham, N. G.; Adama, G.; van Kooyk, Y.; Witte, T. & Figdor, C. G. **Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase.** The American Society of Hematology. 98: 1802-1811. 2001.
- Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. **Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renalallografts.** Kidney Int.;63(4):1564-73.. 2003
- Wen, J.-J. & Garg, N. **Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of Trypanosoma cruzi infection,** Free Radical Biology and Medicine. 37: 2072-2081. 2004.
- Wen, J.-J. ; Yachelini, P. C.; Sembaj, A.; Manzur, R. E. & Garg, N. J. **Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients.** Free Radical Biology and Medicine. 41: 270-276. 2006.
- World Health Organization. **Report of the Scientific working group on Chagas disease.** Tech. Rep., UNDP/World Bank/WHO, Buenos Aires, Argentina. 2006
- Yamada, N.; Yamaya, M.; Okinaga, S.; Nakayama, K.; Sekizawa, K.; Shibahara, S. & Saaki, H. **Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema.** Am J Hum Genet. 66: 187-195. 2000.
- Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, Wiesel P, Christou H, Kourembanas S, Lee ME. **Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice.** J Clin Invest.103(8):R23-9. 1999.
- Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, Ith B, Melo LG, Zhang L, Ingwall JS, Dzau VJ, Lee ME, Perrella MA. **Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice.** Circ Res. 89(2):168-73. 2001.
- Yoshida T, Kikuchi G. **Purification and properties of heme oxygenase from rat liver microsomes.** J Biol Chem. 254(11):4487-91. 1979.

Yoshida T, Kikuchi G. **Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes.** J Biol Chem. 253(12):4224-9. 1978.

Zaki MH, Fujii S, Okamoto T, Islam S, Khan S, Ahmed KA, Sawa T, Akaike T. **Cytoprotective function of heme oxygenase 1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis.** J Immunol. 182(6):3746-56. 2009.

Zelenay S, Chora A, Soares MP, Demengeot J. **Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function.** Int Immunol. 19(1):11-8. 2007.

Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, Tokunaga F, Iwai K, Igarashi K. **Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1.** Mol Cell Biol. 27(19):6962-71. 2007.

Zenke-Kawasaki, Y.; Dohi, Y.; Katoh, Y.; Ikura, T.; Ikura, M. & et al. **Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1.** Mol. Cell Biol. 27: 6962-6971. 2007.

Zhang L, Tarleton RL. **Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental Trypanosoma cruzi infections.** Exp Parasitol.;84(2):203-13. 1996.

Zhang, L. & Tarleton, R . **Characterization of cytokine production in murine trypanosome cruzi infection by in situ immunohistochemistry: lack dissociation between susceptibility and type 2 cytokine production.** European Journal of Immunology. 26: 102-109.1996.

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](#)