

**BÁRBARA NERY PORTO**

**PAPEL DO HEME (FERRO PROTOPORFIRINA IX) NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA: MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO  
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS**

**Orientadores: Marcelo Torres Bozza  
Heloísa Werneck de Macedo**

**Universidade Federal Fluminense  
Niterói  
2005**

**BÁRBARA NERY PORTO**

**PAPEL DO HEME (FERRO PROTOPORFIRINA IX) NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA: MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO  
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS**

**Orientadores: Marcelo Torres Bozza  
Heloísa Werneck de Macedo**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.  
Área de Concentração: Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

**Dra. Rita Fucs**  
Universidade Federal Fluminense

**Dra. Adriana Ribeiro Silva (Examinadora Prévia)**  
Fundação Oswaldo Cruz

**Dr. Aurélio Vicente Graça-Souza**  
Universidade Federal do rio de Janeiro

Niterói  
2005

Porto, Bárbara Nery

Papel do Heme (Ferro Protoporfirina IX) na resposta inflamatória: mecanismos moleculares envolvidos no recrutamento de neutrófilos. Niterói. Universidade Federal Fluminense, 2005. 100 f.

Dissertação de Mestrado (Patologia Experimental)-  
Curso de Pós-Graduação em Patologia)

I.Resposta Inflamatória. II.Heme. II.Neutrófilo.  
1.Universidade Federal Fluminense. 2.Título.

# SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	<u>1</u>
<u>RESUMO</u>	<u>5</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>6</u>
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>7</u>
<u>2. REVISÃO DE LITERATURA</u>	<u>11</u>
2.1. A RESPOSTA INFLAMATÓRIA	11
2.2. A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE AS INFECÇÕES	13
2.3. OS FATORES QUIMIOTÁTICOS PARA NEUTRÓFILOS	15
2.4. O PAPEL DO HEME NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	21
2.5. DESORDENS HEMOLÍTICAS E INFLAMAÇÃO	31
<u>3. OBJETIVOS</u>	<u>34</u>
3.1. OBJETIVO GERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
<u>4. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>35</u>
4.1. REAGENTES	35
4.2. ANIMAIS	35
4.3. SOLUÇÕES-ESTOQUE DE HEME E SEUS ANÁLOGOS	36
4.4. PERITONITE AGUDA EM CAMUNDONGOS	36
4.5. ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	37
4.6. QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS	38
	90

4.7. DOSAGEM DE CITOCINAS	39
4.8. MÉTODO PARA ANÁLISE DOS RESULTADOS	40
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<hr/>	
5.1. EFEITO DO SANGUE, HEMOGLOBINA E HEME SOBRE O RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS IN VIVO.	41
5.2. HEME INDUZ, DE FORMA DOSE-DEPENDENTE, O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O PERITÔNIO DE CAMUNDONGOS.	44
5.3. HEME INDUZ A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IN VIVO.	46
5.4. A PROTOPORFIRINA IX INDUZ, DE MANEIRA DOSE-DEPENDENTE, A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS IN VIVO.	49
5.5. MOLÉCULAS ANÁLOGAS AO HEME INDUZEM O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS IN VIVO.	52
5.6. OS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO HEME TÊM EFEITOS OPOSTOS SOBRE O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS IN VIVO.	55
5.7. AS MESOPORFIRINAS NÃO TÊM A CAPACIDADE DE RECRUTAR NEUTRÓFILOS IN VIVO.	57
5.8. A MESOPORFIRINA IX ANTAGONIZA O EFEITO DO HEME SOBRE O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS IN VIVO.	59
5.9. O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDO POR HEME NÃO DEPENDE DE TLR-4.	62
5.10. O HEME E A PROTOPORFIRINA IX INDUZEM A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS IN VITRO.	65
5.11. EFEITO DA TOXINA PERTUSSIS SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS IN VITRO INDUZIDA POR HEME.	68
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
<hr/>	
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>81</b>
<hr/>	
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>83</b>
<hr/>	

## LISTA DE ABREVIATURAS

20-OH-LTB <sub>4</sub>	20-Hidroxi-Leucotrieno B <sub>4</sub>
ALA-D	δ-Aminolevulinato Dehidratase
ALA-S	δ-Aminolevulinato Sintase
BLT	Receptor de Leucotrieno B <sub>4</sub>
BSA	Soroalbumina Bovina
CAP37	<i>Cationic Antimicrobial Protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CINC	Quimiocina de Neutrófilo induzida por Citocina
CLP	Perfuração e Ligação Cecal
CO	Monóxido de Carbono
COX	Ciclooxigenase
CPO	Coproporfirinogênio III Oxidase
DAG	Diacilglicerol
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC	Ferroquelatase
fMLP	formil-Metil-Leucil-Fenilalanina
FPR	Receptor de fMLP
GDP	Difosfato de Guanosina
Gi	Proteína G inibitória
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G
GRO-α	<i>Growth Regulated Protein-α</i>

GTP	Trifosfato de Guanosina
Hb	Hemoglobina
HBP	<i>Heparin Binding Protein</i>
HbS	Hemoglobina falciforme
HBSS	Solução Salina de Hanks
HETE	Ácido Hidroxieicosatetraenóico
HO	Heme Oxigenase
Hp	Haptoglobina
Hpx	Hemopexina
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
hsp32	<i>Heat Shock Protein 32</i>
HUVEC	Célula Endotelial da Veia Umbilical Humana
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutível
kDa	Quilo Dalton
LFA-1	Antígeno associado à Função de Linfócitos (CD11a/CD18)
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
Mac-1	Antígeno de Macrófago (Integrina CD11b/CD18)
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófagos

MLCK	Quinase de Cadeia Leve de Miosina
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear- $\kappa$ B
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógeno
PBGD	Porfobilinogênio Deaminase
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PI3K	Fosfoinositol 3-quinase
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato
PKC	Proteína Quinase C
PPIX	Protoporfirina IX
PPO	Protoporfirinogênio III Oxidase
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
PSGL-1	Ligante 1 de P-Selectina
PTX	Toxina Pertussis
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
URO-D	Uroporfirinogênio III Descarboxilase
URO-S	Uroporfirinogênio III Sintase



VCAM-1

Molécula de Adesão Vascular-1

## RESUMO

Heme (Ferro Protoporfirina IX), uma molécula ubíqua presente em organismos de todos os reinos, é composta de um átomo de ferro ligado a um anel tetrapirrólico. Como grupamento prostético de apoproteínas inativas, o heme desempenha várias funções biológicas determinadas em parte pelo polipeptídeo associado a ele. Doenças de hemólise elevada ou dano celular extensivo podem levar a altos níveis de heme livre, como a anemia falciforme, malária, febres hemorrágicas e sepse. O heme induz estresse oxidativo e tem diversas propriedades pró-inflamatórias. Uma das principais características da resposta inflamatória é o recrutamento de leucócitos da vasculatura para os tecidos. O heme parece afetar este processo de muitas maneiras: a) induzindo a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais *in vitro* ou *in vivo*; b) aumentando a permeabilidade vascular; c) aumentando a expressão e secreção de quimiocinas; d) induzindo a migração de leucócitos *in vivo* e *in vitro*. O mecanismo pelo qual o heme ativa as células do sistema imune inato causando inflamação não é totalmente compreendido. Nós recentemente observamos que o heme ativa macrófagos através do TLR-4. Considerando que o heme induz a migração de neutrófilos *in vitro*, nós hipotetizamos que o heme tenha um efeito quimiotático direto sobre este leucócito através da ativação de um receptor acoplado a proteína G. Nós mostramos que o heme induz a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* e estimula a secreção de citocinas de forma dose-dependente. Sangue, hemoglobina e diversos análogos do heme apresentam uma capacidade semelhante em recrutar neutrófilos *in vivo*. Por outro lado, a biliverdina e as mesoporfirinas não são eficientes em recrutar neutrófilos e o tratamento com mesoporfirina *in vivo* inibe o efeito do heme sobre o recrutamento. Finalmente, o efeito quimiotático do heme foi revertido com o uso de toxina pertussis. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que o heme induza a quimiotaxia de neutrófilos através da ativação de um receptor acoplado a proteína G.

## ABSTRACT

Heme (Iron Protoporphyrin IX), a ubiquitous molecule present in organisms of all kingdoms, is composed of an atom of iron linked to the four ligand groups of porphyrin. As a prosthetic moiety on inactive apo-heme proteins, heme provides a wide range of biological functions determined in part by the polypeptide associated to it. Diseases of increased hemolysis or extensive cell damage can lead to high levels of free heme, as sickle cell anemia, malaria, hemorrhagic fevers, and sepsis. Heme induces oxidative stress and has several proinflammatory activities. A hallmark of the inflammatory response is the recruitment of leukocytes out of the vasculature to tissues. Heme seems to affect this process in several ways: a) inducing cell adhesion molecule expression on endothelial cells *in vitro* or *in vivo*; b) increasing vascular permeability; c) enhancing chemokine expression and secretion; d) inducing migration of leukocytes *in vivo* and *in vitro*. The mechanism by which heme activates cells of the innate immune system causing inflammation is not fully characterized. We have recently observed that heme activates macrophages through TLR-4. Considering that heme induces neutrophil migration *in vitro*, we hypothesize that heme has a direct chemotactic effect on this leukocyte through activation of a G protein coupled receptor. In the present work we show that heme induces neutrophil migration *in vivo* and *in vitro* and stimulates the secretion of the inflammatory cytokines, IL-6 and TNF- $\alpha$ , in a dose-dependent fashion. Blood, hemoglobin and diverse heme analogs are also able to induce neutrophil recruitment. In contrast, biliverdin and mesoporphyrins are not efficient to recruit neutrophil and mesoporphyrin treatment *in vivo* inhibits the heme-induced neutrophil migration. Finally, the chemotactic effect of heme was abolished by pertussis toxin treatment *in vitro*. Taken together, these results suggest that heme induces neutrophil chemotaxis by activation of a G protein coupled receptor.

# 1. INTRODUÇÃO

A ativação do sistema imune inato é essencial na resposta a infecções, participando da eliminação do agente infeccioso, da ativação da resposta imune adaptativa e do remodelamento tecidual. A resposta imune/inflamatória disparada por moléculas de patógenos é amplificada por mediadores endógenos, como citocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio (Nathan, 2002). Em diversas doenças infecciosas, a ativação do sistema imune e a inflamação subsequente não são apenas responsáveis pela proteção, mas podem estar decisivamente envolvidas com a patogênese. Por esta razão, a resposta inflamatória tem sido associada com a imagem de uma faca de dois gumes, ao mesmo tempo protetora e lesiva. Doenças que apresentam hemólise intra e extravascular ou dano tecidual extenso podem causar a elevação de heme livre, como na anemia falciforme, trauma, malária, febres hemorrágicas (Dengue, Febre da Crimeia, Vírus Marburg e Ebola), leptospirose e choque séptico. O heme livre induz estresse oxidativo e apresenta diversas atividades pró-inflamatórias, incluindo ativação e migração de leucócitos, aumento da expressão de moléculas de adesão e indução de citocinas e proteínas de fase aguda (Wagener *et al.*, 2003).

O heme é uma molécula não-protéica que constitui o grupamento prostético de várias proteínas, tais como catalase, fosfodiesterase, citocromo C, óxido nítrico sintase, entre outras. Além disso, o heme é o responsável por enlaçar oxigênio na

hemoglobina. O heme consta de uma parte orgânica e um átomo de ferro. A parte orgânica, denominada protoporfirina IX, é formada por um anel tetrapirrólico e o ferro está ligado no centro deste anel. A degradação do heme é catalisada pela Heme Oxigenase (HO), gerando biliverdina, ferro e monóxido de carbono (Ponka, 1999). Tem sido apontado um papel para os produtos de reação da HO-1, CO e biliverdina, como importantes antioxidantes, antiinflamatórios e antiapoptóticos (Sikorski *et al.*, 2004). A importância da HO-1 na degradação do heme e o seu envolvimento nos processos inflamatórios foi observada em um paciente e em camundongos deficientes de HO-1. A ausência de HO-1 é consistente com elevados níveis de heme no soro e várias complicações oxidativas e inflamatórias, tais como anemia, deposição de ferro nos rins e no fígado, esplenomegalia, leucocitose, injúria endotelial, entre outras (Yachie *et al.*, 1999). Além disso, animais HO-1<sup>-/-</sup> são altamente sensíveis à endotoxemia com elevada deposição de ferro no fígado e necrose deste órgão (Poss e Tonegawa, 1997). Muitos trabalhos têm apontado um papel para o heme nos processos inflamatórios. A administração intravenosa de heme em camundongos induz um acúmulo de leucócitos, principalmente granulócitos, no baço, fígado, rins e pâncreas (Wagener *et al.*, 2001b). Estes resultados se correlacionaram com um aumento da expressão de moléculas de adesão como molécula de adesão vascular (VCAM)-1, molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, fibronectina e P-selectina no endotélio vascular. O tratamento dos animais com um inibidor da HO-1 aumentou os efeitos do heme na migração celular e na necrose hepática observada (Wagener *et al.*, 2001b). Em modelos de inflamação local induzida pela administração intradérmica de óleo turpentina em ratos, o heme induz um aumento na síntese de proteínas

de fase aguda, como a  $\alpha$ -2 macroglobulina (Lyoumi *et al.*, 1999). O efeito produzido pelo heme endógeno foi inibido após o tratamento dos animais com um inibidor da biossíntese do heme.

O papel pró-inflamatório do heme foi corroborado em estudos de migração e ativação de neutrófilos (Graça-Souza *et al.*, 2002). Estes autores mostraram que o heme induz de maneira dose-dependente a migração de neutrófilos tanto *in vivo* quanto *in vitro* por uma via dependente de proteína quinase C (PKC). Além disso, o heme foi capaz de induzir a ativação de neutrófilos observada pela presença de ânions superóxido produzidos por estas células, bem como um aumento nos níveis de mRNA de interleucina (IL)-8 (Graça-Souza *et al.*, 2002). Esta ativação parece apresentar algumas semelhanças com o mecanismo desencadeado por ligantes de receptores quimiotáticos nestes leucócitos. De fato, as diversas moléculas com característica quimiotática ativam receptores específicos da família de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), os quais direcionam a polimerização de actina e contração, regulam mudanças na morfologia celular e conseqüentemente o tráfego de leucócitos no sistema imune (Rot e Von Andrian, 2004).

O mecanismo molecular envolvido nos efeitos inflamatórios do heme é atribuído à sua natureza anfipática e ao seu efeito pró-oxidante, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Balla *et al.*, 1993); (Balla *et al.*, 2000); (Wagener *et al.*, 2003). Dados recentes obtidos em nosso laboratório indicam que o heme é capaz de ativar macrófagos murinos, induzindo a secreção de fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ . Este efeito é dependente do receptor TLR

(*Toll-like receptor*)-4, já que macrófagos de camundongos geneticamente deficientes de TLR-4 não produzem TNF- $\alpha$  quando estimulados com heme.

Os mecanismos moleculares responsáveis pela inflamação observada em desordens hemolíticas e o papel do heme em células do sistema imune inato requerem investigações. **Nossa hipótese é de que o grupamento heme induza a migração de neutrófilos através da ligação a receptores com sete regiões transmembranares acoplados a proteínas G.** Desta forma, o heme, quando liberado em grandes quantidades, agiria como um mediador capaz de disparar e perpetuar respostas inflamatórias ou contribuir para a amplificação da imunidade inata.

No presente trabalho, utilizamos um modelo murino de peritonite aguda, em que é feita uma injeção intraperitoneal de heme e após um período de tempo determinado são analisadas as mudanças no perfil de células recrutadas para a cavidade peritoneal destes animais, com o objetivo de se determinar o papel do heme durante a resposta inflamatória aguda. Além disso, o efeito do heme sobre a migração de neutrófilos humanos *in vitro* é avaliado, a fim de se determinar os mecanismos envolvidos no recrutamento destas células induzido por heme.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A Resposta Inflamatória

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

Os neutrófilos atingem os sítios inflamatórios, como outros leucócitos, migrando através da parede das vênulas de pequeno calibre, cujas células



endoteliais expressam moléculas de adesão complementares às que são expressas na superfície destes leucócitos (as principais classes envolvidas são as selectinas e as integrinas). Os estímulos inflamatórios liberados por leucócitos e células endoteliais iniciam o processo de adesão, aumentando a exteriorização de P-selectina, que é armazenada em forma inativa nos corpúsculos de Weibel-Palade dentro das células endoteliais. A interação entre P-selectina na superfície das células endoteliais e Ligante 1 de P-Selectina (PSGL-1) na superfície dos neutrófilos, promove o rolamento destas células sobre o endotélio de vasos sanguíneos nos sítios inflamatórios. A expressão adicional de outras moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, como ICAM-1 e a interação desta com integrinas na superfície dos neutrófilos, Mac-1 e antígeno associado à função de linfócitos (LFA)-1, são necessárias para a adesão firme e a migração transendotelial (Wagner e Roth, 2000); (Muller, 2003). Além disso, a migração através do endotélio requer um aumento transitório no nível de cálcio intracelular nas células endoteliais. Este aumento de cálcio livre intracelular ativa uma quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), a qual fosforila a miosina II. Isto induz a retração das células endoteliais, permitindo a passagem dos neutrófilos. Dentre os fatores que podem disparar o aumento na concentração intracelular de cálcio nas células endoteliais, estão algumas proteínas catiônicas liberadas por neutrófilos estimulados, tais como a azurocidina (também conhecida como CAP37 – “*Cationic Antimicrobial Protein*” ou HBP – “*Heparin Binding Protein*”) (Pettit e Fay, 1998); (Muller, 2003); (Edens e Parkos, 2003). Uma vez no tecido, os neutrófilos migram em direção ao sítio de injúria por quimiotaxia. Esta migração direcionada dos neutrófilos é governada por sinais extracelulares, como gradientes quimiotáticos

(que podem ser solúveis, exibidos na matriz extracelular, ou apresentados na superfície de outras células), sinais de adesão que promovem a migração dependente de substrato (haptotaxia) ou uma combinação dos dois (Vicente-Manzanares e Sánchez-Madrid, 2004); (Van Buul e Hordijk, 2004).

## **2.2. A Resposta Inflamatória durante as Infecções**

O disparo da resposta inflamatória é um fator crucial durante um processo infeccioso. A detecção inicial de agentes microbianos depende de receptores especializados, que reconhecem moléculas expressas exclusivamente por microrganismos. Em animais, a detecção de agentes microbianos é mediada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). A estrutura de cada PAMP é altamente conservada e invariante em microrganismos da mesma classe; assim, os animais podem reconhecer a maioria dos microrganismos utilizando um número limitado de PRRs (Inohara e Nuñez, 2003). Os receptores Toll (TLR – *Toll-like receptors*) estão envolvidos no reconhecimento de componentes microbianos, como lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas, flagelina e DNA não-metilado. Além disso, os TLR reconhecem ligantes endógenos induzidos durante a resposta inflamatória (Akira e Takeda, 2004). O reconhecimento intracelular de certos patógenos parece envolver uma família de proteínas chamada NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), a qual inclui NOD1 e NOD2 – proteínas que

reconhecem o peptídeo glicano bacteriano no citoplasma (Inohara e Nuñez, 2003); (Akira e Takeda, 2004).

Os membros da família TLR são expressos diferencialmente entre as células imunes e parecem responder a estímulos diferentes. Além disso, outros tipos celulares, incluindo células endoteliais vasculares, adipócitos, miócitos cardíacos e células epiteliais intestinais também expressam TLRs. Em mamíferos, a ativação de TLRs induz a produção e secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias, através da ativação de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B (Akira e Takeda, 2004). Dentre as citocinas pró-inflamatórias secretadas sob ativação dos TLRs, destacam-se o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e a interleucina (IL)-1. Estas citocinas estão presentes na maioria das respostas inflamatórias e sua fonte celular principal são macrófagos. A ligação do TNF- $\alpha$  a seu receptor expresso na superfície de neutrófilos induz a ativação e expressão de integrinas, produção de fator ativador de plaquetas (PAF) e outros mediadores e liberação do conteúdo granular. Da mesma maneira, as células endoteliais mobilizam selectinas, aumentam a expressão de ICAM-1 e ativam vias pró-coagulantes em resposta à exposição ao TNF- $\alpha$ . Assim como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 induz a expressão de selectinas e ICAM-1 na superfície das células endoteliais e promove a ativação de integrinas na superfície dos neutrófilos (Wagner e Roth, 2000). Deste modo, estas citocinas exibem efeitos pró-migratórios sobre os neutrófilos, promovendo eventos necessários para a migração destas células durante a resposta inflamatória.

### **2.3. Os Fatores Quimiotáticos para Neutrófilos**

A migração de leucócitos através do endotélio é dirigida principalmente por uma grande família de citocinas quimiotáticas, as quimiocinas. Além destas, outras moléculas estão envolvidas no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório e incluem peptídeos bacterianos [por exemplo, formil-Met-Leu-Fe (fMLP)], mediadores lipídicos ou componentes do sistema complemento (por exemplo, C5a). Os fatores quimiotáticos para neutrófilos podem ser produzidos por uma ampla variedade de células, incluindo células endoteliais e epiteliais, macrófagos, monócitos, linfócitos, plaquetas, os próprios neutrófilos e células parenquimais (Van Buul e Hordijk, 2004); (Vicente-Manzanares e Sánchez-Madrid, 2004).

As quimiocinas são moléculas pequenas, estruturalmente relacionadas, com peso molecular que varia de 8 a 14 kDa e são responsáveis pela regulação direta do tráfego de leucócitos no sistema imune (Rollins, 1997); (Van Buul e Hordijk, 2004). A maioria das quimiocinas apresenta quatro resíduos de cisteína N-terminais característicos e, dependendo do arranjo formado pelas duas primeiras cisteínas, elas são classificadas em quatro classes: CXC ou  $\alpha$ , porque as duas primeiras cisteínas são separadas por um único aminoácido; CC ou  $\beta$ , onde as duas cisteínas são adjacentes; C ou  $\gamma$ , porque existe apenas uma cisteína no domínio N-terminal e CX<sub>3</sub>C ou  $\delta$ , onde as duas primeiras cisteínas são intercaladas por três aminoácidos (Rollins, 1997); (Rossi e Zlotnik, 2000). Estudos de modelagem sugerem que a estrutura tridimensional das quimiocinas pode acomodar somente 0, 1 ou 3 aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas, o que explica a ausência de uma classe de quimiocinas CX<sub>2</sub>C (Rollins, 1997).

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

A IL-8 é um fator quimiotático muito potente para neutrófilos, além de ativar tais células. A expressão do gene e a produção de IL-8 são controladas por diversos mediadores presentes no sítio inflamatório. Enquanto LPS, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são capazes de aumentar a produção de IL-8, a IL-10 é um potente inibidor da síntese de IL-8 (Pease e Sabroe, 2002). Em adição, o tratamento de neutrófilos com altas doses de fMLP ou LTB<sub>4</sub> na presença de concentrações fisiológicas de fibrinogênio induzem a síntese de IL-8 por essas células. Isto sugere que o fibrinogênio funciona como um efetor durante a evolução da resposta imune inata, promovendo um maior recrutamento de neutrófilos através da indução da síntese de IL-8 (Kuhns *et al.*, 2001).

Os receptores de quimiocina CXCR1 e CXCR2 são expressos principalmente em neutrófilos e ligam a quimiocina IL-8. Enquanto a IL-8 é o agonista primário do CXCR1, outras seis quimiocinas, incluindo GRO- $\alpha$ , CXCL5 e CXCL7 ligam ao CXCR2. Embora os dois receptores ativem a mesmas proteínas G, CXCR1 parece ativar seletivamente a fosfolipase D e o surto respiratório no

neutrófilo, enquanto CXCR2 parece ser mais importante na quimiotaxia (Rose *et al.*, 2004). Além disso, CXCR2 parece utilizar proteínas G distintas para induzir funções diferentes em neutrófilos de ratos. A quimiotaxia promovida por quimiocina de neutrófilo induzida por citocina (CINC)-1 e CINC-3 é sensível à inibição por toxina Pertussis, enquanto que a mobilização de cálcio induzida por CINC-1 e CINC-3 é insensível (Shibata *et al.*, 2002).

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

As ações intercelulares do PAF são mediadas por receptores acoplados a proteínas G, os quais são expressos na superfície de uma variedade de tipos celulares. O sinal gerado pela ativação do receptor de PAF induz um acúmulo de fosfatidilinositol e aumento no nível de cálcio intracelular. Estas respostas são inibidas por análogos do trifosfato de guanosina (GTP), mas reagem de maneiras distintas à Toxina Pertussis, sugerindo que duas proteínas G diferentes estão envolvidas na sinalização do receptor de PAF (Prescott *et al.*, 2000).

O leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) é um mediador inflamatório extremamente potente derivado dos fosfolípidios da membrana celular pelas ações seqüenciais de três enzimas: fosfolipase A<sub>2</sub>, 5-lipoxigenase e LTA<sub>4</sub> hidrolase. O LTB<sub>4</sub> participa do recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação, direcionando a migração destas células. Foi demonstrado que o LTB<sub>4</sub> é um potente fator quimiotático para neutrófilos humanos *in vivo*: a injeção subcutânea de LTB<sub>4</sub> induz o recrutamento de neutrófilos para a pele. Além de ser quimiotático para neutrófilos, o LTB<sub>4</sub> também é capaz de ativar estas células e prolongar sua sobrevivência, através da inibição da apoptose (Tager e Luster, 2003). Foram descritos dois receptores para LTB<sub>4</sub> – BLT1 (Yokomizo *et al.*, 1997) e BLT2 (Yokomizo *et al.*, 2000a). Os receptores BLT1 e BLT2 são ativados por LTB<sub>4</sub> e, numa extensão menor, por 20-hidróxi-LTB<sub>4</sub> (20-OH-LTB<sub>4</sub>) e ácido 12-(R)-hidróxieicosatetraenóico (12-(R)-HETE) (Brink *et al.*, 2003); (Tager e Luster, 2003). O BLT1 é expresso predominantemente em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. A expressão do BLT1 é induzida em macrófagos ativados, sugerindo uma associação deste receptor em várias desordens inflamatórias. O BLT2 é considerado um receptor de baixa afinidade para o LTB<sub>4</sub> e sua distribuição tecidual é variada (Brink *et al.*, 2003). Os receptores BLT1 e BLT2 possuem a estrutura típica dos receptores quimiotáticos, com sete domínios transmembranares e acoplados à proteína G. A ativação destes receptores por LTB<sub>4</sub> induz quimiotaxia e quimiocinese de neutrófilos e estas respostas são abolidas pelo pré-tratamento das células com toxina Pertussis, sugerindo que proteínas G inibitórias são requeridas para as atividades quimiotáticas e quimiocinéticas dependentes de LTB<sub>4</sub> (Yokomizo *et al.*, 2000b).

A anafilatoxina C5a é um potente agonista para células mielóides, especialmente neutrófilos, os quais expressam altos níveis do receptor de C5a (C5aR ou CD88) e apresentam uma resposta quimiotática quando estimulados com esta molécula. C5a induz muitas características da resposta inflamatória aguda, incluindo vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local, contração do músculo liso, edema, aumento da temperatura no tecido e acúmulo de neutrófilos em sítios extravasculares. Além de ser quimiotático para neutrófilos, C5a tem a capacidade de inibir a apoptose destas células. O receptor de C5a é um membro da família dos receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembranares (Ward, P, 2004).

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

As moléculas descritas acima ativam receptores específicos da família de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), os quais direcionam a polimerização de actina e contração, regulam mudanças na morfologia celular e conseqüentemente o tráfego de leucócitos no sistema imune. A família GPCR



também ativa outras vias de sinalização, regulando processos como ativação celular, excitose, mudanças na adesividade da célula e apoptose (Rose *et al.*, 2004); (Rot e Von Andrian, 2004); (Vicente-Manzanares e Sánchez-Madrid, 2004).

A maioria dos receptores de quimiocina sinaliza predominantemente via membros da classe G inibitória (Gi) de proteínas G sensíveis à toxina Pertussis (PTX). A ligação da quimiocina às porções extracelulares de seu receptor modifica a estrutura terciária do receptor, permitindo à parte intracelular ligar e ativar proteínas G heterotriméricas. Em resposta, as proteínas G ativadas trocam difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (GTP) e se dissociam em subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$ . As subunidades  $\beta\gamma$  que se dissociam da subunidade  $G_{i\alpha}$  medeiam sinais induzidos por quimiocinas e ativam diversas fosfolipases ( $A_2$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , D) e proteínas quinases (fosfoinositol 3-quinase, proteína quinase C e tirosina quinases). Isto resulta em acúmulo de mediadores lipídicos, como fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato, fluxo de cálcio e ativação de GTPases monoméricas, as quais coordenam os processos de adesão celular, polimerização de actina e eventos contráteis, polarizam a célula e permitem o movimento celular (Katanaev, 2001); (Cicchetti *et al.*, 2002); (Niggli, 2003); (Rot e Von Andrian, 2004); (Ward, S, 2004).

As principais GTPases envolvidas na migração celular são Rho, Rac e Cdc42. Estas GTPases são membros da superfamília Ras de proteínas monoméricas ligadoras de GTP (Bishop e Hall, 2000). A fosfoinositol 3-quinase (PI3K) ativada pela subunidade  $\beta\gamma$  gera fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> ativa a GTPase monomérica Rac, que é indispensável para a polimerização de actina e migração de leucócitos. Entretanto, a sinalização mediada por Rac é

suficiente para ativar a maquinaria de actina que propõe a célula, mas é insuficiente para suportar a locomoção unidirecional da célula, a “marca registrada” da quimiotaxia. A migração unidirecional requer outra GTPase monomérica, a Cdc42. Sem a ativação da Cdc42, os leucócitos exibem uma migração randômica quando colocados frente a um gradiente quimiotático (Rot e Von Andrian, 2004). Além disso, estas GTPases estão envolvidas em muitos outros processos celulares que são dependentes do citoesqueleto de actina, como citocinese, fagocitose, pinocitose, morfogênese, entre outros (Bishop e Hall, 2000).

#### **2.4. O Papel do Heme na Resposta Inflamatória**

O heme (Ferro Protoporfirina IX) é um complexo não-protéico constituído de um átomo de ferro ligado a quatro grupos de porfirina (FIG. 1). Sua síntese ocorre em todas as células humanas nucleadas a partir de glicina e succinil-CoA, e envolve uma série de reações enzimáticas que tomam lugar parcialmente dentro da mitocôndria e parcialmente no citoplasma (FIG. 2) (Wagener *et al.*, 2003). Devido à importância da biossíntese de heme nos processos biológicos, um defeito parcial em uma das enzimas usadas na síntese desta molécula é associado com diversos estados patológicos. Exemplos dessas desordens herdadas ou adquiridas são porfirias, síndrome mielodisplásica e anemia sideroblástica (Wagener *et al.*, 2003).

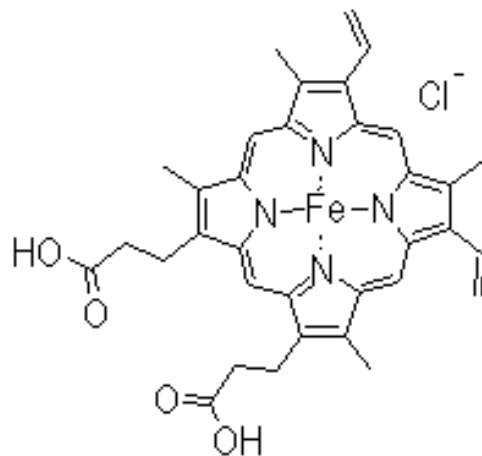


FIGURA 1 – Estrutura do heme (Ferro Protoporfirina IX). O heme consta de uma parte orgânica e um átomo de ferro. A parte orgânica, denominada protoporfirina IX, é formada por um anel tetrapirrólico e o ferro está ligado no centro deste anel.

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

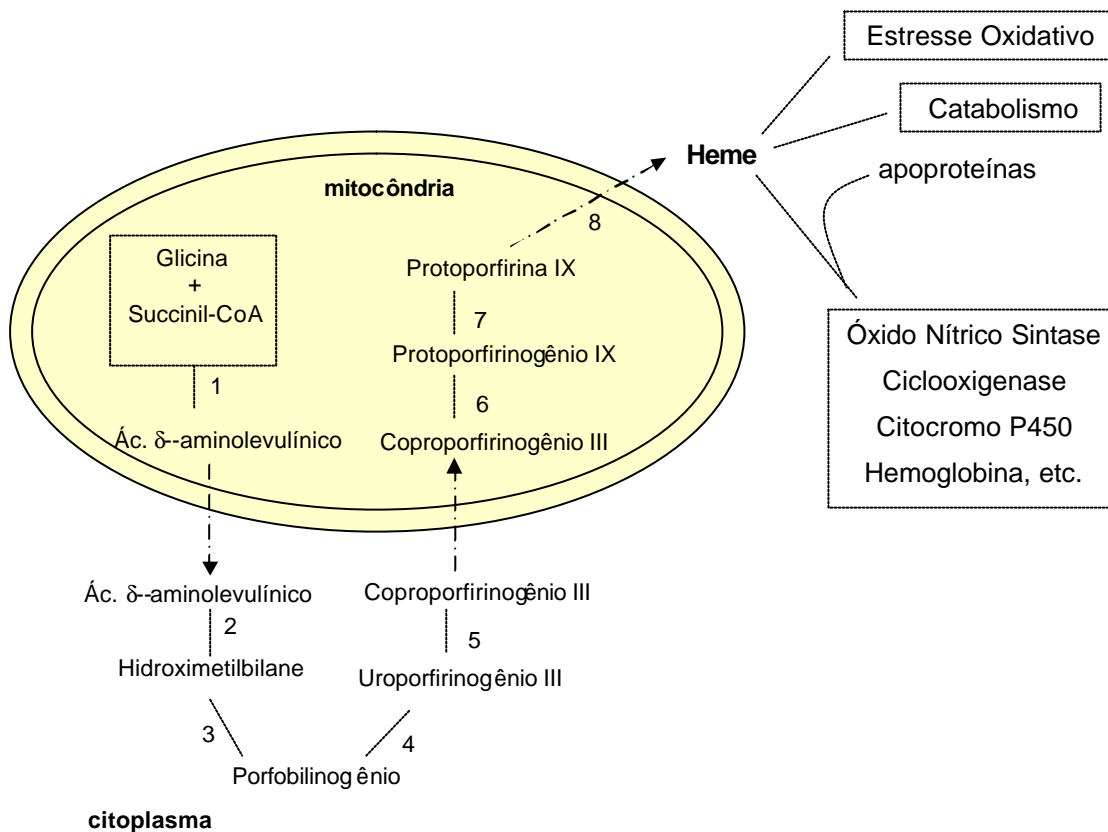


FIGURA 2 – Biossíntese do heme. A formação do heme a partir de glicina e succinil-CoA envolve a participação seqüencial de oito enzimas diferentes: 1) δ-aminolevulinato sintase (ALA-S); 2) δ-aminolevulinato desidratase (ALAD); 3) porfobilinogênio deaminase (PBGD); 4) uroporfirinogênio III sintase (URO-S);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

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

Graça-Souza e colegas mostraram que a injeção intratorácica de heme em ratos induz uma reação inflamatória e acúmulo intenso de neutrófilos nas cavidades pleurais destes animais. Além disso, o heme induz a migração de neutrófilos humanos *in vitro*, dispara o burst oxidativo e promove polimerização de actina, indicando que heme é um potente ativador de neutrófilos (Graça-Souza *et al.*, 2002).

Recentemente, Arruda e colaboradores demonstraram que o heme livre é capaz de retardar a apoptose de neutrófilos humanos *in vitro*, em concentrações encontradas durante eventos hemolíticos *in vivo*. Este efeito foi dependente da atividade da heme oxigenase-1 e da geração de espécies reativas de oxigênio. Estes dados sugerem que heme pode contribuir para o desenvolvimento de

inflamação crônica associada com episódios hemolíticos, retardando a apoptose e promovendo a sobrevivência de neutrófilos (Arruda *et al.*, 2004).

A grande reatividade do heme e sua capacidade de induzir dano tecidual implicam na necessidade de um sistema eficiente de catabolismo desta molécula. De fato, o heme induz a síntese da heme oxigenase-1 (HO-1), responsável por sua degradação.

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

Numerosos estudos têm demonstrado que a HO-1 apresenta efeitos antiinflamatórios, diminuindo a expressão de moléculas de adesão e enzimas pró-inflamatórias, como COX-2 (Vachharajani *et al.*, 2000); (Vicente *et al.*, 2003). Alguns destes efeitos parecem ser mediados pela inibição da atividade de fatores de transcrição críticos para a expressão de genes pró-inflamatórios, como NF- $\kappa$ B (Soares *et al.*, 2004). Além disso, a HO-1 medeia os efeitos antiinflamatórios da IL-10, tanto *in vivo* como *in vitro*, em camundongos (Lee e Chau, 2002). Em adição, a expressão da HO-1 está significativamente aumentada nas células inflamatórias durante a fase de resolução da inflamação (Willis *et al.*, 1996). A HO-1 também parece ser importante na proteção contra a toxicidade das hemoproteínas *in vivo*, já que camundongos que não expressam HO-1 apresentam falência renal aguda e mortalidade acentuada quando recebem doses de hemoglobina que não são nefrotóxicas para camundongos selvagens (Nath *et al.*, 2000).

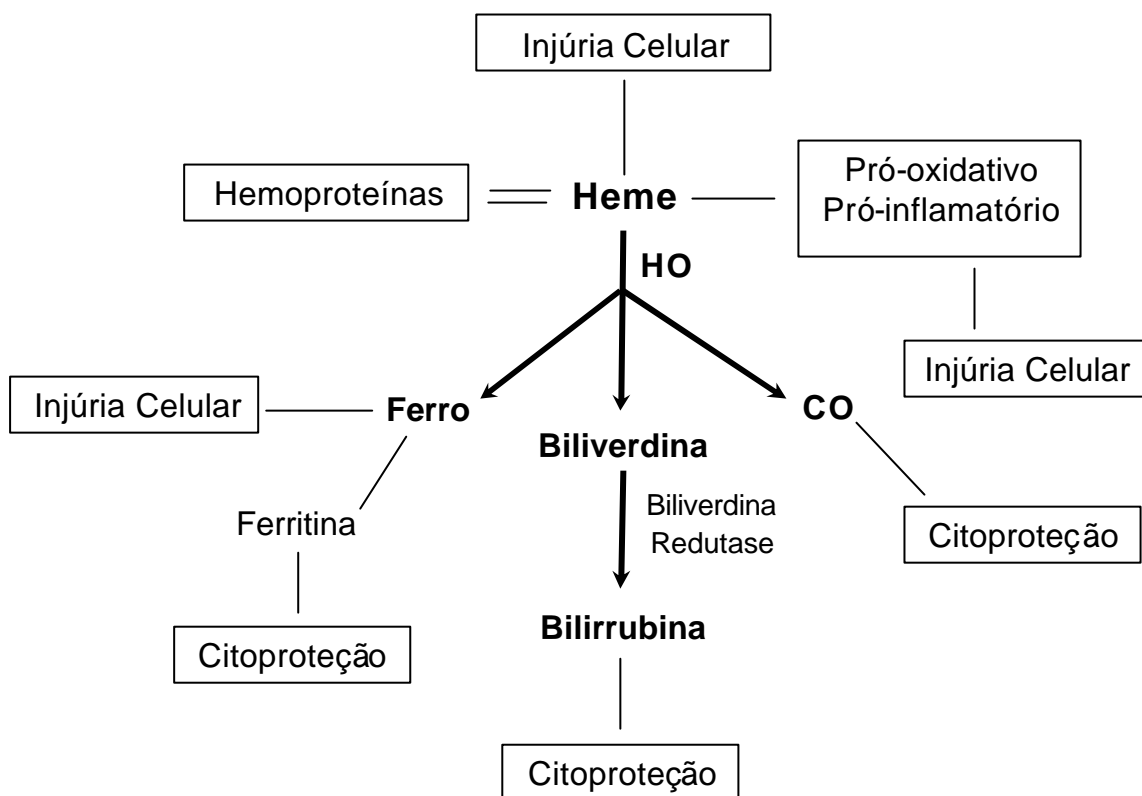


FIGURA 3 – Degradação do heme pela heme oxigenase (HO). O heme derivado das hemoproteínas ou recém-sintetizado é degradado pela HO em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro. A biliverdina é convertida em bilirrubina pela ação da biliverdina redutase. O ferro é diretamente sequestrado pela ferritina. Os produtos de quebra do heme possuem diversas propriedades fisiológicas. Adaptado de (Wagener *et al.*, 2003).



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

Como a produção de monóxido de carbono (CO) pode refletir um aumento na expressão da HO-1 durante condições de estresse oxidativo, Horvath e colegas investigaram os níveis de CO exalado por pacientes com bronquiectasia, uma doença pulmonar inflamatória associada à produção aumentada de oxidantes, devido à infiltração neutrofílica. Os autores relataram que os pacientes com a doença apresentavam níveis mais elevados de CO exalado em comparação com os indivíduos controles, sugerindo que a medida de CO exalado pode atuar como um marcador da inflamação e estresse oxidativo em pacientes com bronquiectasia

(Horvath *et al.*, 1998). Por outro lado, o CO parece estar envolvido na redução da resposta inflamatória no pulmão asmático. Em um modelo murino de asma, a administração de CO exógeno diminuiu significativamente o número de leucócitos infiltrantes no lavado broncoalveolar, incluindo eosinófilos, e a produção de IL-5, sugerindo que o CO pode funcionar como modulador da resposta inflamatória alérgica na asma (Chapman *et al.*, 2001). Além disso, o CO é capaz de inibir a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e MIP (proteína inflamatória de macrófagos)-1 $\beta$ , e de aumentar a produção da citocina antiinflamatória IL-10, em um modelo de inflamação induzida por LPS (Otterbein *et al.*, 2000). Assim, o CO poderia ser usado no tratamento do choque séptico e outras desordens inflamatórias.

Além da enzima HO-1, há uma série de proteínas plasmáticas que são capazes de ligar o heme livre circulante, com a finalidade de controlar os efeitos deletérios desta molécula. A hemopexina (Hpx), junto com a haptoglobina (Hp) e transferrina, formam o quarto grupo mais abundante de proteínas plasmáticas depois da albumina, imunoglobulinas e proteases plasmáticas. A Hpx é uma proteína ligadora de heme de 60kDa e que apresenta uma alta afinidade pelo heme ( $K_d < 1\text{pM}$ ). A Hpx é sintetizada principalmente pelas células parenquimais hepáticas, mas os neurônios do sistema nervoso periférico, as células ganglionares e o ovário também constituem sítios de síntese de Hpx. Os receptores de hemopexina são expressos principalmente no fígado, mas eles também foram detectados em células polimorfonucleares, células epiteliais

pigmentares da retina e em algumas células de linhagens pró-mielocíticas, como HL-60 e U937 (Delanghe e Langlois, 2001).

Os complexos heme-Hpx ligam-se aos receptores de hemopexina nas células parenquimais hepáticas e são então endocitados. Assim, o heme chega ao citoplasma para ser degradado pela HO e a Hpx é devolvida intacta à circulação depois de ter liberado o heme intracelularmente. Além disso, a ligação do complexo heme-Hpx ao receptor de Hpx estimula a expressão do gene da HO-1 (Delanghe e Langlois, 2001).

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

A Haptoglobina (Hp) é a principal proteína plasmática que liga a hemoglobina (Hb) livre, com uma grande afinidade ( $K_d \sim 1\text{pM}$ ). Através da rápida formação de complexos Hp-Hb, a Hp marca a Hb livre para que seja degradada nos hepatócitos, reduzindo o dano renal induzido pela Hb (Lim *et al.*, 2000). Recentemente, uma proteína expressa em macrófagos, CD163, foi identificada como um receptor que seqüestra a hemoglobina livre, mediando a endocitose de complexos Hp-Hb (Kristiansen *et al.*, 2001). Tanto a expressão do CD163, como a da Hp são aumentadas por mediadores da resposta de fase aguda, como IL-6 (Kristiansen *et al.*, 2001). A endocitose de complexos Hp-Hb mediada por CD163 induz a degradação lisossomal da proteína ligante e metabolismo do heme pela HO citosólica. Assim, a expressão aumentada de Hp, CD163 e HO-1 durante a

resposta de fase aguda, leva à regulação da inflamação através de dois mecanismos: 1) a sinalização mediada por CD163 resulta em mobilização de  $Ca^{+2}$  intracelular, produção de inositol trifosfato e secreção aumentada de citocinas antiinflamatórias; 2) a liberação intracelular de Hb mediada por CD163 no macrófago leva à degradação do heme pela HO-1, e os produtos de quebra do heme têm potentes efeitos antiinflamatórios (Moestrup e Moller, 2004).

A Hp parece ser um importante agente antioxidante que age principalmente no tecido renal, durante hemólise. Camundongos nocaute para Hp (Hp<sup>-/-</sup>) apresentam dano renal e estresse oxidativo renal mais pronunciados, com perda da função do órgão durante hemólise, em comparação com os animais selvagens (Lim *et al.*, 2000). Além disso, camundongos Hp-Hpx duplo-nocaute (Hp<sup>-/-</sup> Hpx<sup>-/-</sup>) têm esplenomegalia, inflamação hepática acentuada e fibrose durante hemólise aguda induzida por fenilhidrazina, sugerindo que a Hp e a Hpx podem influenciar o processo inflamatório gerado por desordens hemolíticas (Tolosano *et al.*, 2002).

## **2.5. Desordens Hemolíticas e Inflamação**

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

A anemia falciforme é um bom exemplo de doença hemolítica, que apresenta um certo grau de inflamação e onde as altas concentrações de heme livre intravascular podem desempenhar um papel-chave. A anemia falciforme é uma desordem sangüínea molecular que é causada pela substituição de um único aminoácido na cadeia  $\beta$  da hemoglobina (chamada HbS). A HbS polimeriza com a desoxigenação, produzindo uma hemácia em forma de foice, que é menos deformável e que pode obstruir os vasos sangüíneos. Além dos problemas clínicos característicos da doença, as oclusões vasculares são a principal causa de dor, morbidade e mortalidade associadas com esta desordem. Os pacientes que sofrem de anemia falciforme exibem uma inflamação crônica de baixo grau que é associada com expressão aumentada de moléculas de adesão em células endoteliais ativadas, leucócitos e reticulócitos (Wagener *et al.*, 2001a). Foi demonstrado que as hemácias falciformes têm um efeito direto sobre as células endoteliais, induzindo um aumento na produção de moléculas de adesão por estas células, o que cria um ambiente vascular que favorece eventos de adesão (Shiu *et al.*, 2000). Além disso, evidências crescentes sugerem a presença de interações célula endotelial-reticulócito e célula endotelial-leucócito na doença (Turhan *et al.*, 2002). Assim, em adição à mutação pontual em um gene que codifica a Hb, a adesão aumentada de células sangüíneas à parede dos vasos tem importância significativa na patogênese desta desordem (Wagener *et al.*, 2001a).

A Hb mutada (HbS) torna a hemácia frágil, mais propensa à hemólise, o que resulta em grandes concentrações de Hb e heme livres, os quais podem interagir com o endotélio (Wagener *et al.*, 2001a). Foi demonstrado que o heme

induz a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina em células endoteliais (Wagener *et al.*, 1997). Deste modo, o heme derivado das hemácias falciformes pode levar à vaso-oclusão através da indução de moléculas de adesão e aderência de células sangüíneas ao endotélio. Além disso, a primeira linha de defesa contra os efeitos deletérios do heme e/ou Hb, hemopexina e haptoglobina, respectivamente, freqüentemente encontra-se diminuída em pacientes com anemia falciforme. Isto resulta em perda da proteção contra a adesão induzida pelo heme (Wagener *et al.*, 2001a).

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. *Objetivo Geral*

Avaliar os mecanismos moleculares envolvidos no recrutamento de leucócitos, especialmente neutrófilos, induzido por heme.

### 3.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito de diferentes doses de heme no recrutamento de neutrófilos *in vivo*;
- Analisar o efeito de análogos do heme no recrutamento de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*;
- Caracterizar o papel do TLR-4 no recrutamento de neutrófilos induzido por heme;
- Avaliar o efeito do sangue e da hemoglobina na migração de leucócitos *in vivo*;
- Analisar o efeito da toxina Pertussis (PTX) na migração de neutrófilos *in vitro* induzida pelo heme.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes

O heme (Ferro-Protoporfirina IX), Estanho-Protoporfirina IX, Manganês-Protoporfirina IX, Mesoporfirina, Ferro-Mesoporfirina e Paládio-Mesoporfirina foram obtidos comercialmente da Porphyrin Products, Inc. A Protoporfirina IX foi obtida da Aldrich. A Zinco-Protoporfirina IX e a Biliverdina Dihidroclorato foram provenientes da ICN Biomedicals, Inc. A Bilirrubina, o LPS (*E. coli* 0111:B4), o meio RPMI 1640 e o Tween 20 foram obtidos comercialmente da Sigma. O soro fetal bovino (FCS) e a solução salina de Hanks (HBSS) foram obtidos comercialmente da Hyclone. A Toxina Pertussis foi proveniente da Calbiochem. O Leucotrieno B<sub>4</sub> foi obtido da Cayman Chemical.

### 4.2. Animais

Nos experimentos cujo objetivo foi caracterizar o efeito do heme e das moléculas análogas ao heme sobre o recrutamento de neutrófilos *in vivo*, foram utilizados camundongos da linhagem C57/BL6. Nos experimentos visando caracterizar o papel do receptor TLR-4 no recrutamento de neutrófilos induzido por heme, foram usados camundongos da linhagem C57/BL10 ScCr, que apresentam uma deleção no gene *Tlr4* e não expressam o receptor TLR-4 (Poltorak *et al.*,



1998). Como controle, foram usados animais C57/BL10. Os animais utilizados neste trabalho foram provenientes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e do Biotério da Universidade Federal Fluminense (UFF).

### **4.3. Soluções-estoque de Heme e seus Análogos**

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

### **4.4. Peritonite Aguda em Camundongos**

A peritonite aguda foi induzida com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de heme (3-300µg/cavidade), sangue (200µL), hemoglobina (15µg/cavidade), protoporfirina IX (PPIX; 6-600µg/cavidade), zinco-PPIX, estanho-PPIX, mesoporfirina, ferro-mesoporfirina, paládio-mesoporfirina, biliverdina ou bilirrubina (100µg/cavidade) em um volume de 200µL. Os animais do grupo controle receberam uma injeção i.p. de solução salina apirogênica no mesmo volume. Após 4 horas, os animais foram sacrificados e as cavidades peritoneais foram lavadas com 3mL de PBS gelado. O número de leucócitos totais presentes no fluido

peritoneal foi contado em câmara de Neubauer, após diluição com Turk. Além disso, os leucócitos presentes no fluido peritoneal foram citocentrifugados, fixados e corados com o kit Diff-Quick (Baxter Travenol Laboratories), para que fosse feita a contagem diferencial das células recrutadas em microscópio óptico, sob objetiva de imersão.

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

O lavado peritoneal coletado dos animais foi centrifugado a 1100 rpm por 10 minutos. O lavado peritoneal livre de células foi congelado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Para a dosagem de citocinas, a peritonite aguda foi induzida com uma injeção i.p. de heme nos animais em diferentes tempos e diferentes doses (50-5000µg/cavidade).

#### ***4.5. Isolamento de Neutrófilos Humanos***

Os neutrófilos foram coletados do sangue periférico de voluntários humanos saudáveis em seringas heparinizadas. O sangue foi diluído 2X em solução salina de Hanks (HBSS), adicionado lentamente sobre um gradiente de Ficoll (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS.) (10mL de Ficoll para 20mL de sangue) e centrifugado a

1100 rpm, por 45 minutos em temperatura ambiente. Após este período, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 9mL de água deionizada gelada e 3mL de cloreto de potássio 0,6M gelado ao pellet formado por hemácias e granulócitos, para a lise das hemácias. Os neutrófilos foram então ressuspensos em meio RPMI 1640. A viabilidade e a pureza dos neutrófilos sempre foram maiores do que 99% e 97%, respectivamente.

#### **4.6. Quimiotaxia de Neutrófilos**

Os ensaios de quimiotaxia foram feitos em microplacas de quimiotaxia de 96 poços (ChemoTx System, NeuroProbe, Inc.).

Os indutores da quimiotaxia de neutrófilos (heme, PPIX) foram adicionados nos poços inferiores da placa em meio RPMI 1640, na presença de 1% de soro fetal bovino (FCS), em um volume de 300 $\mu$ L. Os neutrófilos suspensos em meio RPMI 1640 foram adicionados nos poços superiores da placa ( $5 \times 10^4$  células/50 $\mu$ L) e incubados por 2 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a incubação, os neutrófilos que migraram para os poços inferiores foram coletados e contados em câmara de Neubauer. A migração dos neutrófilos em direção ao meio RPMI 1640 sozinho (migração randômica) foi utilizada como controle negativo e a migração em direção ao Leucotrieno B<sub>4</sub> (10nM) foi usada como controle positivo.

Para avaliar o envolvimento de receptores acoplados à proteína G na migração de neutrófilos induzida por heme, os neutrófilos humanos foram pré-

tratados com toxina Pertussis (100ng/mL) por 3 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

O índice quimiotático foi calculado como sendo o número de células que migraram em direção ao estímulo dividido pelo número de células que migraram em direção ao meio RPMI 1640 sozinho. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

#### **4.7. Dosagem de Citocinas**

As citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  foram dosadas no lavado peritoneal dos camundongos submetidos à peritonite aguda induzida por salina, heme ou moléculas análogas através de imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando um kit comercialmente disponível (Duo Set Development System, R&D Systems). A dosagem foi feita conforme as instruções do fabricante. Brevemente, uma placa de 96 poços foi coberta com 100 $\mu$ L/poço do anticorpo de captura (2 $\mu$ g/mL) e incubada *overnight* em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada 3X com PBS-Tween 20 0,05% e bloqueada com PBS-BSA 1% por 2 horas. O procedimento de lavagem da placa foi repetido e as amostras foram adicionadas em um volume de 100 $\mu$ L/poço. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Depois disso, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100 $\mu$ L do anticorpo de detecção (200ng/mL) foram adicionados aos poços. Novamente, a placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após isto, a placa foi lavada 3X e foram adicionados 100 $\mu$ L de Streptavidina-HRP (diluída

200X em PBS-BSA 1%) em cada poço. A placa foi protegida da luz e incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. A lavagem foi repetida e 100µL da solução substrato foram adicionados aos poços. A placa foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. A solução de parada (HCl 1N) foi adicionada aos poços em um volume de 50µL e a placa foi lida em um leitor de ELISA (modelo 3550, BioRad) com um comprimento de onda de 490nm. Todas as dosagens foram feitas em duplicata.

#### ***4.8. Método para Análise dos Resultados***

Os resultados obtidos foram analisados com a ajuda do programa *GraphPad Prism 4*, utilizando o Teste t de Student e o Teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados são representados como média + EPM e foram considerados significativos quando  $P \leq 0,05$ .

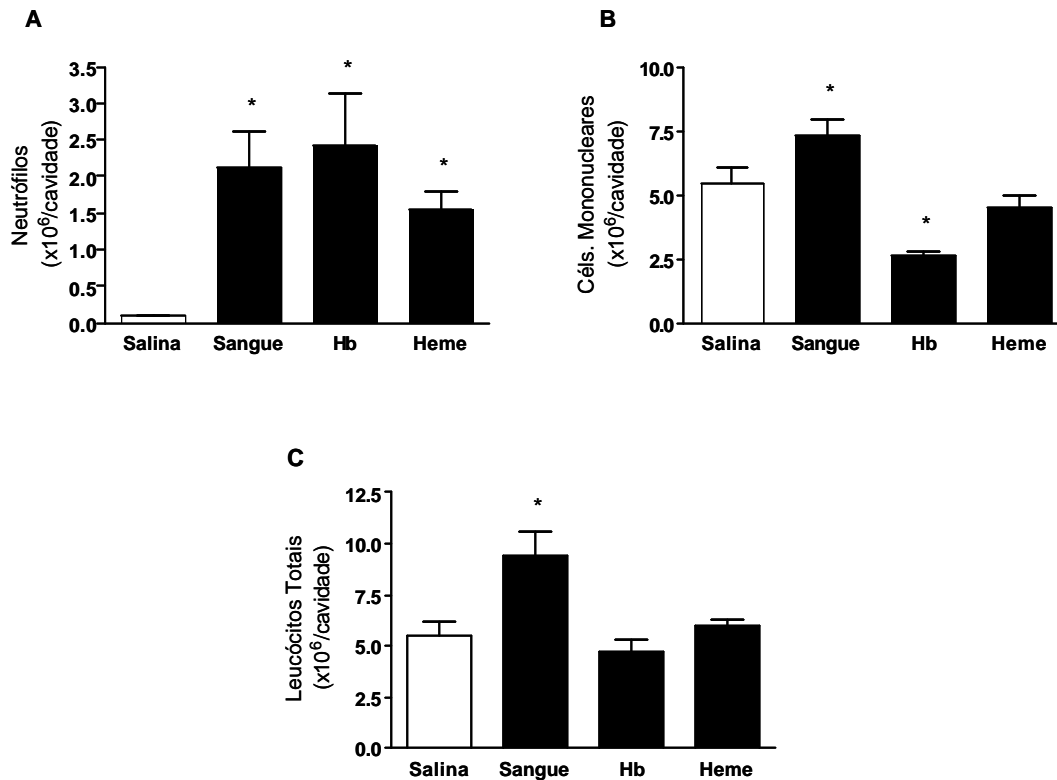
## 5. RESULTADOS

### ***5.1. Efeito do sangue, hemoglobina e heme sobre o recrutamento de leucócitos in vivo.***

A hemólise é uma característica das doenças hemolíticas e hemorrágicas e leva ao aparecimento de altas concentrações de heme livre. Estas desordens são freqüentemente associadas a um processo inflamatório com infiltração de leucócitos, que podem causar lesão tecidual.

Para avaliar o efeito do sangue, da hemoglobina e do heme sobre o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal, os camundongos receberam uma injeção i.p. de sangue total (200µL), hemoglobina (15µg/cavidade), heme (60µg/cavidade) ou salina apirogênica. Após 4 horas, o peritônio foi lavado com PBS gelado e os leucócitos presentes no lavado peritoneal foram contados. O sangue, a hemoglobina e o heme foram capazes de recrutar neutrófilos para a cavidade peritoneal destes animais ( $P < 0,05$  comparado ao grupo controle, tratado com salina) (GRAF. 1A). Além disso, o sangue induziu um aumento significativo no recrutamento de células mononucleares ( $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle) (GRAF. 1B). Em contraste, a hemoglobina se mostrou capaz de diminuir o número de células mononucleares recrutadas para a cavidade peritoneal dos animais ( $P < 0,05$  comparado ao grupo controle) (GRAF. 1B). O heme não induziu modificação no número de células mononucleares

recrutadas (GRAF. 1B). O sangue também foi capaz de aumentar significativamente o número de leucócitos totais recrutados para o peritônio ( $P < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com salina), enquanto a hemoglobina e o heme não induziram modificações significativas no número de leucócitos totais recrutados para a cavidade peritoneal dos camundongos (GRAF. 1C).



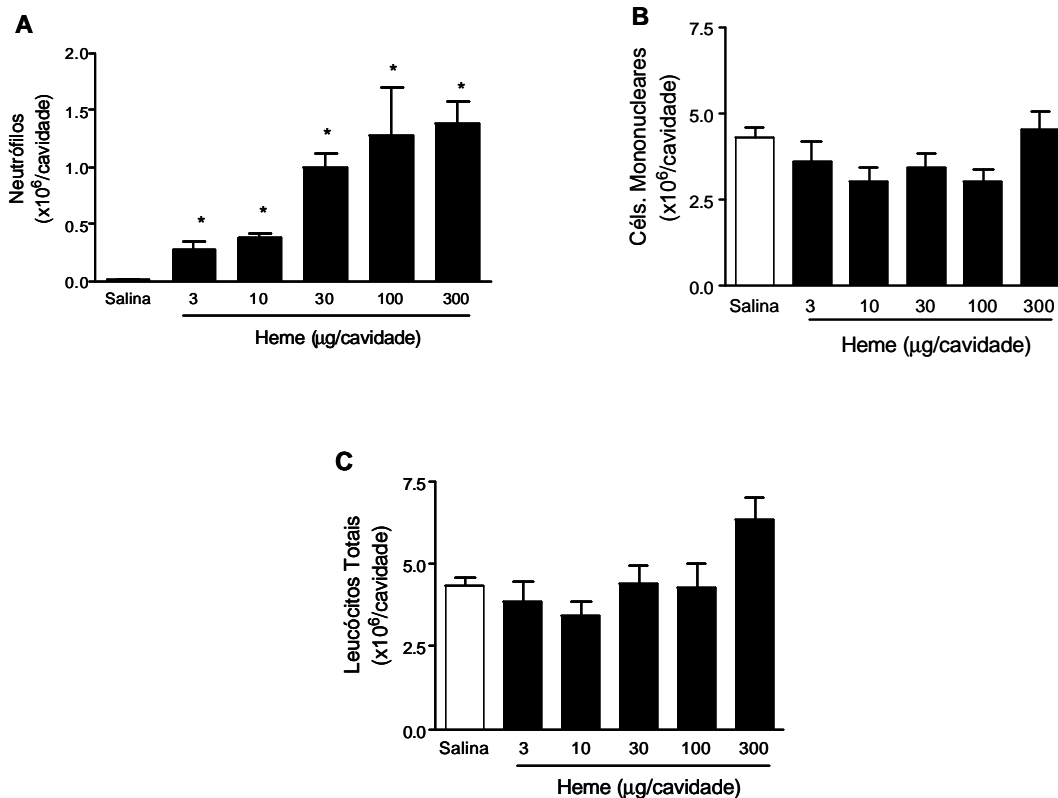
**GRÁFICO 1 – Efeito do sangue, hemoglobina e heme sobre o recrutamento de leucócitos *in vivo*.** Número de (A) neutrófilos; (B) células mononucleares e (C) leucócitos totais presentes no lavado peritoneal de camundongos injetados com sangue total (200 $\mu$ L), hemoglobina (15 $\mu$ g/cavidade), heme (60 $\mu$ g/cavidade) ou salina, após um período de 4 horas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e são as médias + EPM do número de células encontradas no lavado peritoneal destes camundongos. \* $P < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com salina.



## **5.2. Heme induz, de forma dose-dependente, o recrutamento de neutrófilos para o peritônio de camundongos.**

Recentemente, Graça-Souza e colaboradores demonstraram que a injeção intratorácica de heme em ratos induziu uma reação inflamatória e acúmulo intenso de neutrófilos nas cavidades pleurais destes animais (Graça-Souza *et al.*, 2002).

Com base nestes dados, procuramos avaliar se o efeito do heme sobre o recrutamento de neutrófilos seria dependente de dose. Para isso, os animais receberam uma injeção i.p. de diferentes doses de heme (3-300 $\mu$ g/cavidade). Os animais do grupo controle receberam uma injeção i.p. de solução salina apirogênica. Após 4 horas, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS gelado e as células presentes no fluido peritoneal foram contadas. Como mostra o GRAF. 2A, o heme induziu, de forma dose-dependente, o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos ( $P < 0,05$  para todas as doses de heme em comparação com o grupo controle). Por outro lado, nenhuma dose de heme foi capaz de aumentar significativamente o recrutamento de células mononucleares para o peritônio dos animais (GRAF. 2B). Da mesma maneira, o heme não foi capaz de induzir um aumento significativo no número de leucócitos totais presentes no lavado peritoneal dos camundongos (GRAF. 2C).



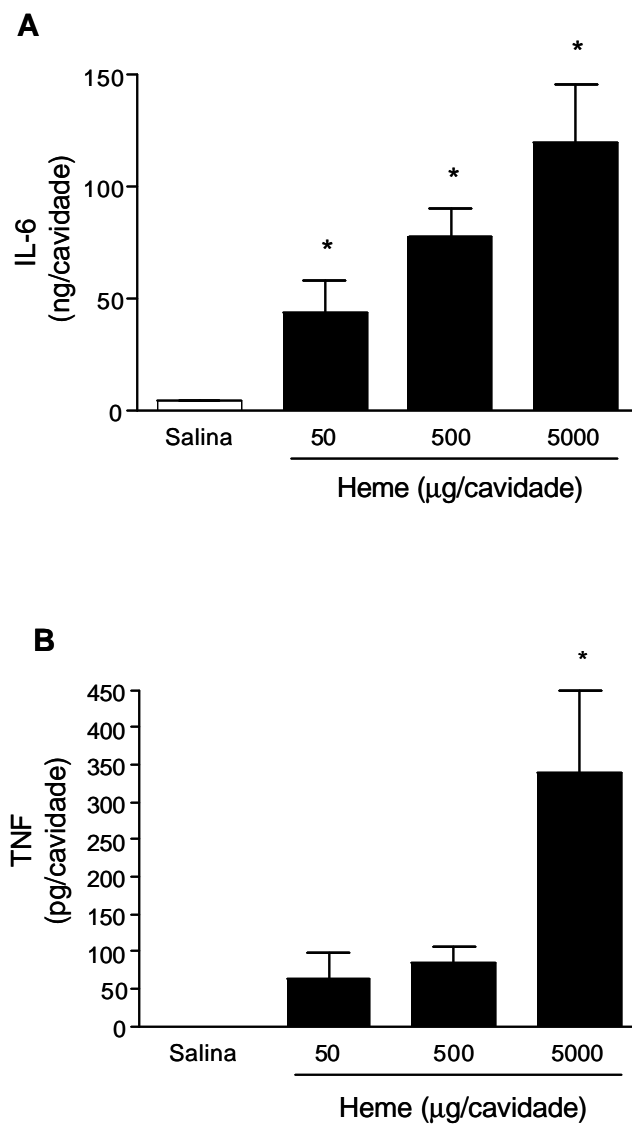
**GRÁFICO 2 – Heme induz, de forma dose-dependente, o recrutamento de neutrófilos para o peritônio de camundongos.** Número de (A) neutrófilos; (B) células mononucleares e (C) leucócitos totais presentes no lavado peritoneal de camundongos injetados com heme (3-300µg/cavidade) ou salina, após um período de 4 horas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e são as médias + EPM do número de células encontradas no lavado peritoneal destes camundongos. \* $P < 0,05$  para todas as doses de heme em comparação com o grupo tratado com salina.

### **5.3. Heme induz a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vivo*.**

Estudos recentes mostram que o heme é um potente indutor da resposta inflamatória. A injeção i.v. de heme resulta em aumento da permeabilidade vascular, expressão de moléculas de adesão e infiltração tecidual de leucócitos, incluindo neutrófilos (Wagener *et al.*, 2001b). Além disso, Graça-Souza e colegas demonstraram que o heme é capaz de disparar o surto oxidativo em neutrófilos humanos e promover polimerização de actina. Os autores também mostraram que a incubação de neutrófilos com heme induz a expressão de IL-8, um importante quimioatraente de neutrófilos (Graça-Souza *et al.*, 2002). O conjunto destes dados indica que o heme é um potente ativador de neutrófilos, estimulando a síntese de citocinas importantes durante a resposta inflamatória. De fato, a migração de leucócitos *in vivo* poderia se dever em parte a um efeito indireto do heme induzindo a produção de mediadores inflamatórios.

Para avaliar se o heme seria capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vivo*, camundongos receberam uma injeção i.p. de várias doses de heme por períodos de tempo diferentes. Grupos de animais receberam injeções i.p. de heme nas doses de 50, 500 e 5000 $\mu$ g/cavidade ou salina por 90 minutos. Outros grupos receberam injeções i.p. de heme nas doses de 60 e 100 $\mu$ g/cavidade ou salina por 4 horas. Após os períodos de incubação citados acima, as cavidades peritoneais dos animais foram lavadas com PBS gelado e o lavado peritoneal foi centrifugado, com a finalidade de se obter um lavado livre de células. As citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  foram dosadas por ELISA nos lavados

peritoneais destes animais. Como mostra o GRAF. 3A, o heme foi capaz de estimular a produção de IL-6 *in vivo*, de maneira dose-dependente, em 90 minutos ( $P < 0,05$  para todas as doses de heme em comparação com o grupo controle). Da mesma maneira, o heme estimulou a produção de TNF- $\alpha$ , de maneira dependente de dose, em 90 minutos de incubação ( $P < 0,05$  para todas as doses de heme comparado ao grupo controle) (GRAF. 3B). Por outro lado, quando os animais foram injetados com heme (60 e 100 $\mu$ g/cavidade) pelo período de 4 horas, não foi possível detectar IL-6 e TNF- $\alpha$  nos lavados peritoneais (dados não mostrados). Estes resultados indicam que o heme tem a capacidade de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vivo*. Este efeito depende do tempo de estímulo e da dose de heme, já que foi possível detectar os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  no lavado dos animais tratados por 90 minutos com doses mais elevadas de heme, mas não foi possível detectar estas citocinas no lavado dos animais tratados com doses menores de heme e por um período mais prolongado (4 horas) (dados não mostrados).



**GRÁFICO 3 – Heme induz a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vivo*.**

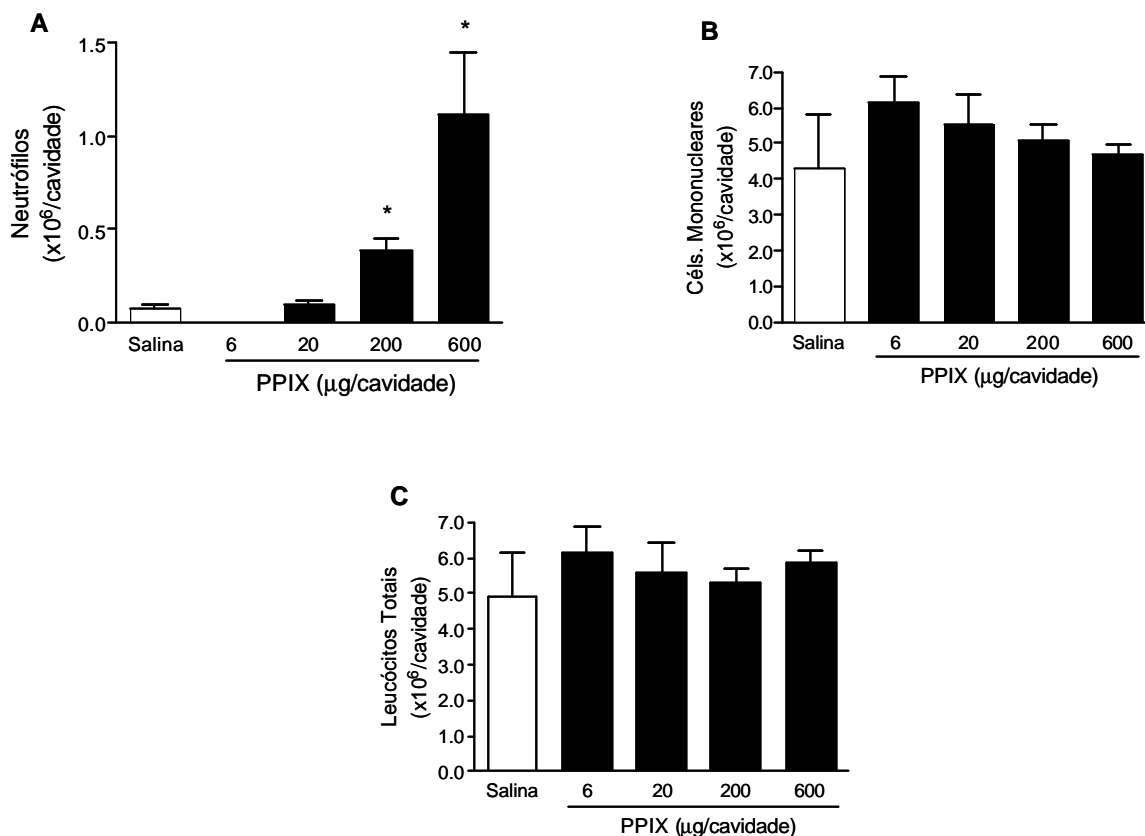
Camundongos receberam uma injeção i.p. de diferentes doses de heme (50-5000µg/cavidade) e após 90 minutos o lavado peritoneal foi coletado e centrifugado. (A) IL-6 e (B) TNF- $\alpha$  foram dosados por ELISA no lavado peritoneal destes animais. Os dados representam as médias + EPM de 5 animais em cada grupo de tratamento. \* $P < 0,05$  em comparação com o grupo injetado com salina.

#### **5.4. A Protoporfirina IX induz, de maneira dose-dependente, a migração de neutrófilos *in vivo*.**

Em um trabalho realizado anteriormente em nosso laboratório (Figueiredo e Bozza, dados não publicados), foi estudado o efeito do heme e moléculas análogas ao heme sobre a ativação de macrófagos murinos. Foi possível mostrar que o heme é capaz de ativar estas células, induzindo a produção de TNF- $\alpha$ . Por outro lado, moléculas com estruturas semelhantes à do heme, incluindo a protoporfirina IX, que não possui o átomo de ferro ligado aos anéis porfirínicos, não têm a capacidade de ativar macrófagos. Estas moléculas antagonizam os efeitos do heme sobre estas células.

Visando esclarecer o efeito da protoporfirina IX (PPIX) sobre o recrutamento de neutrófilos, camundongos receberam uma injeção i.p. de diferentes doses de PPIX (6-600 $\mu$ g/cavidade) e após 4 horas a celularidade do fluido peritoneal foi avaliada. Como controle, os camundongos foram injetados com solução salina apirogênica. Conforme apresentado no GRAF. 4A, a PPIX induziu, de maneira dose-dependente, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos ( $P=0,0143$  para as doses de 200 e 600 $\mu$ g/cavidade em comparação com o grupo controle). Semelhante ao efeito do heme, a PPIX também não foi capaz de induzir um aumento significativo na migração de células mononucleares e leucócitos totais para o peritônio destes animais (GRAF. 4B e C). Estes dados sugerem que a PPIX apresenta efeitos diferentes sobre populações celulares

distintas, uma vez que a PPIX não é capaz de ativar os macrófagos, mas tem a capacidade de recrutar neutrófilos, de modo semelhante ao heme.



**GRÁFICO 4 – A Protoporfirina IX induz, de maneira dose-dependente, a migração de neutrófilos *in vivo*.** Número de (A) neutrófilos; (B) células mononucleares e (C) leucócitos totais presentes no lavado peritoneal de camundongos injetados com diferentes doses de PPIX (6-600µg/cavidade) ou salina, após 4 horas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e são as médias + EPM do número de células encontradas no lavado peritoneal destes camundongos. \* $P=0,0143$  para as doses de 200 e 600µg/cavidade em comparação com grupo injetado com salina.

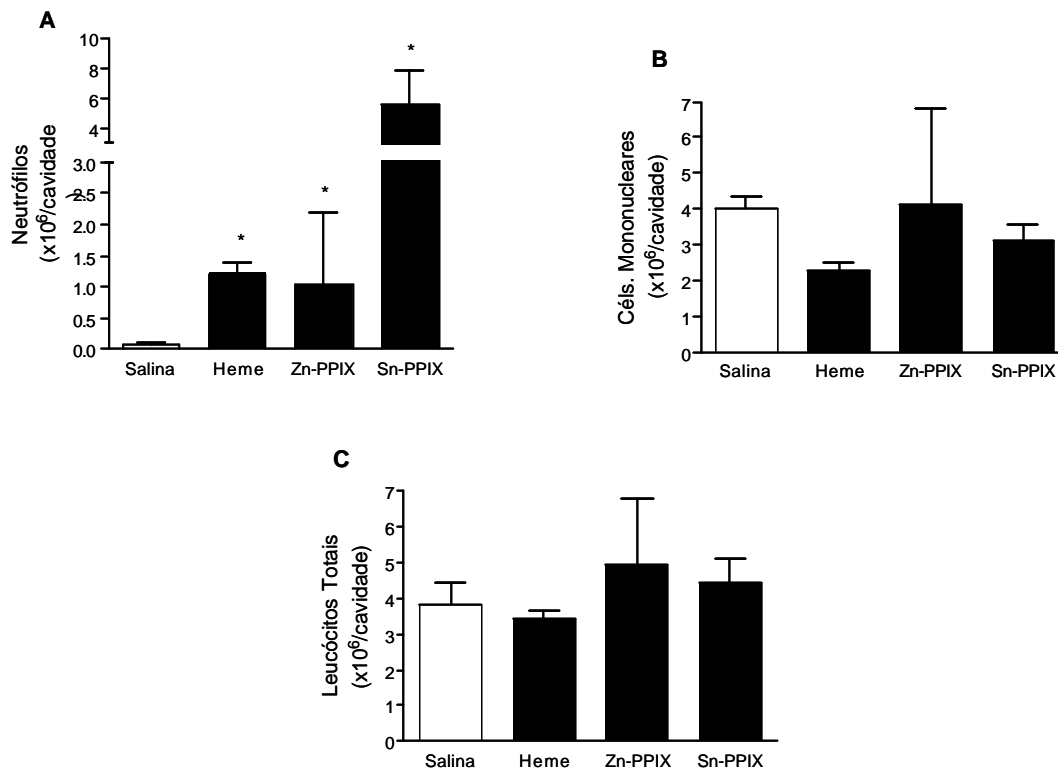


### **5.5. Moléculas análogas ao heme induzem o recrutamento de neutrófilos *in vivo*.**

Dados do nosso laboratório mostram que o heme é capaz de ativar macrófagos murinos levando a secreção de TNF- $\alpha$  e que este efeito depende da presença do ferro, já que moléculas como a protoporfirina IX, que não tem o ferro ligado ao anel porfirínico ou moléculas com íon metálicos distintos ao ferro, não são capazes de ativar tais células (Figueiredo e Bozza, resultados não publicados).

A Zn-PPIX e a Sn-PPIX apresentam em sua estrutura os quatro anéis porfirínicos ligados aos metais zinco e estanho, respectivamente. Com o objetivo de analisar o efeito de moléculas que apresentam uma estrutura semelhante a do heme (porém com outros metais ligados aos anéis de porfirina) sobre o recrutamento de neutrófilos, camundongos C57BL/6 foram injetados i.p. com Zn-PPIX, Sn-PPIX, heme (100 $\mu$ g/cavidade) ou salina apirogênica. Após 4 horas, a celularidade do lavado peritoneal foi avaliada. Conforme apresentado no GRAF. 5A, o heme, a Zn-PPIX e a Sn-PPIX induziram significativamente o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos ( $P < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com salina). De fato, a Sn-PPIX foi cerca de 3 a 4 vezes mais potente que o heme no recrutamento de neutrófilos. Por outro lado, nenhuma das moléculas foi capaz de induzir significativamente o recrutamento de células mononucleares e leucócitos totais para o peritônio destes animais ( $P > 0,05$  quando comparado ao grupo controle) (GRAF. 5B e C). Estes resultados sugerem

que o recrutamento de neutrófilos é independente do íon ferro, uma vez que moléculas com estruturas análogas à do heme, porém com outros íons metálicos ligados aos anéis porfirínicos, têm a capacidade de recrutar neutrófilos *in vivo*.

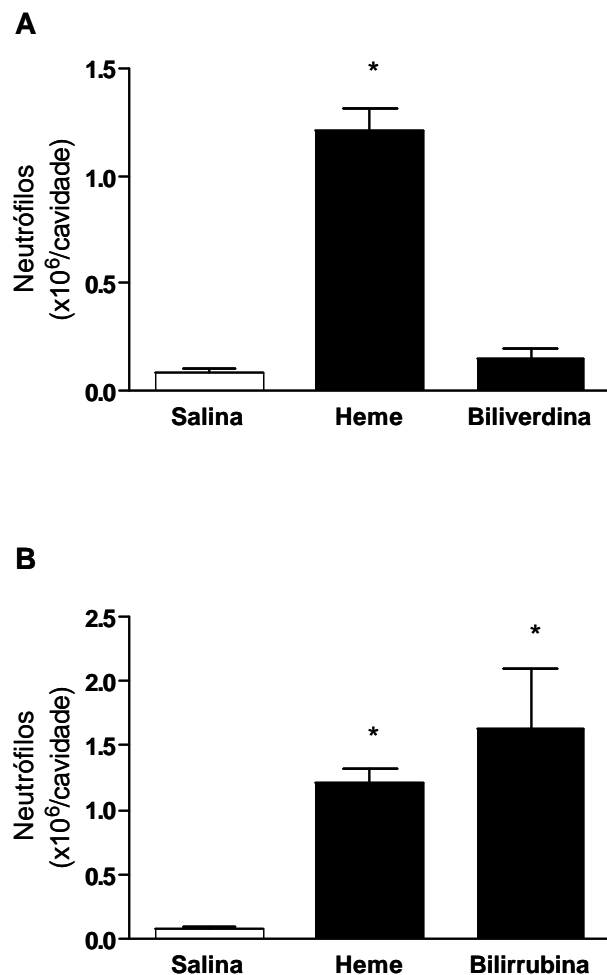


**GRÁFICO 5 – Moléculas análogas ao heme induzem o recrutamento de neutrófilos *in vivo*.** Número de (A) neutrófilos; (B) células mononucleares e (C) leucócitos totais presentes no lavado peritoneal de camundongos injetados com heme, Zn-PPIX, Sn-PPIX (100 $\mu$ g/cavidade) ou salina, após um período de 4 horas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e são expressos como as médias + EPM do número de células encontradas no lavado peritoneal destes camundongos. \* $P < 0,05$  para heme, Zn-PPIX e Sn-PPIX em relação ao grupo tratado com salina.

**5.6. Os produtos de degradação do heme têm efeitos opostos sobre o recrutamento de neutrófilos *in vivo*.**

Como os produtos da degradação do heme têm sido descritos como potentes agentes antiinflamatórios em modelos de inflamação, transplantes e estresse oxidativo, nós resolvemos investigar o papel da Biliverdina e da Bilirrubina sobre o recrutamento de neutrófilos *in vivo*.

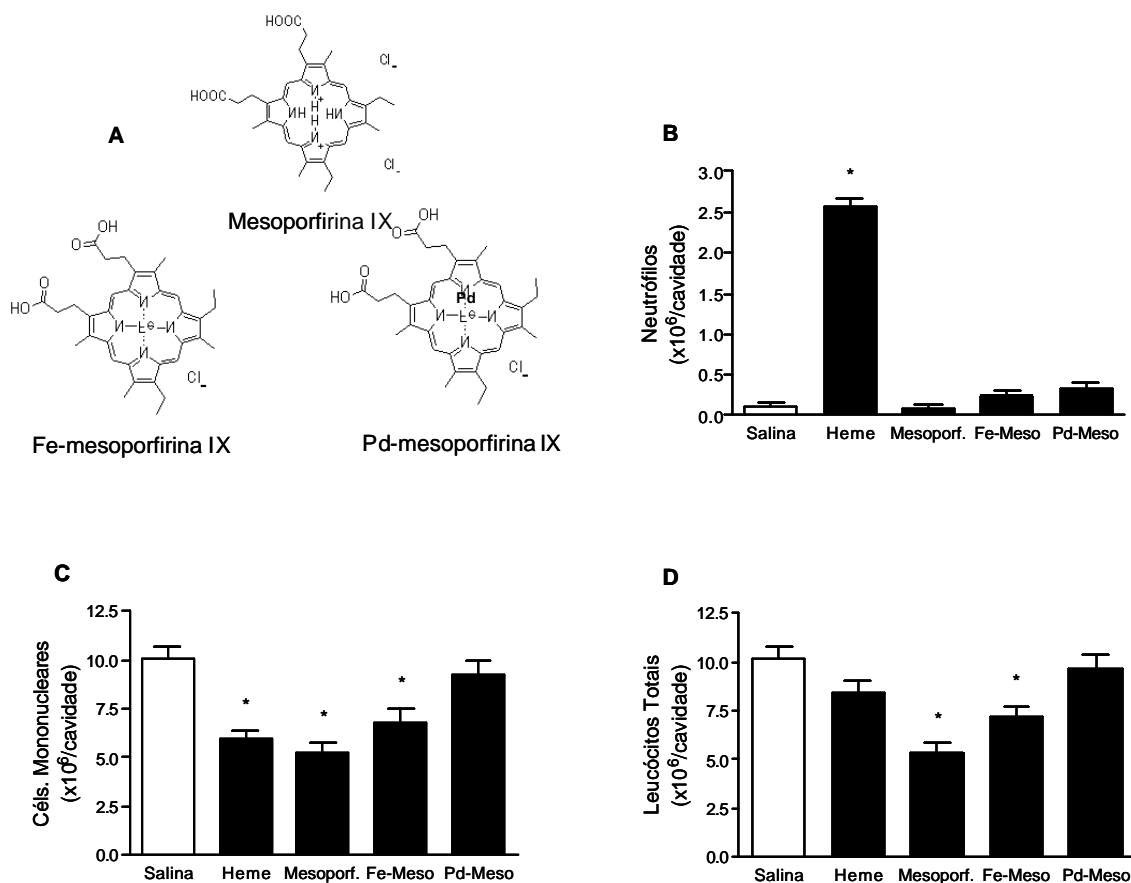
Para isso, camundongos C57BL/6 receberam uma injeção i.p. de heme, biliverdina, bilirrubina (100µg/cavidade) ou salina. Depois de um período de 4 horas, as células presentes no fluido peritoneal foram contadas. Como pode ser observado no GRAF. 6A, a biliverdina não teve capacidade de induzir o recrutamento de neutrófilos. Por outro lado, a bilirrubina foi capaz de recrutar neutrófilos para a cavidade peritoneal destes animais, assim como o heme ( $P=0,05$  em comparação com o grupo controle) (GRAF. 6B). Estes dados sugerem que os produtos de quebra do heme, biliverdina e bilirrubina, apresentam efeitos opostos sobre o recrutamento de neutrófilos.



**GRÁFICO 6 – Os produtos de degradação do heme têm efeitos opostos sobre o recrutamento de neutrófilos *in vivo*.** Número de neutrófilos presentes no lavado peritoneal de camundongos injetados com heme, biliverdina (A), bilirrubina (B) (100µg/cavidade) ou salina, após 4 horas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e são expressos como as médias + EPM do número de células encontradas no lavado peritoneal destes camundongos. \* $P < 0,05$  em comparação com o grupo injetado com salina.

### **5.7. As Mesoporfirinas não têm a capacidade de recrutar neutrófilos *in vivo*.**

Uma vez que nós demonstramos que o recrutamento de neutrófilos induzido por heme é independente do íon ferro, já que moléculas análogas ao heme têm a capacidade de induzir a migração de neutrófilos, nós procuramos avaliar se alterações no anel porfirínico levariam à incapacidade de recrutar neutrófilos. As mesoporfirinas apresentam uma diferença estrutural no anel porfirínico em relação às protoporfirinas. As mesoporfirinas possuem grupos etilas no lugar dos grupamentos vinis. Os camundongos receberam uma injeção i.p. de mesoporfirina IX, ferro-mesoporfirina IX, paládio-mesoporfirina IX, heme (100µg/cavidade) ou solução salina. Após 4 horas, a celularidade do fluido peritoneal foi avaliada. O heme induziu a migração de neutrófilos para o peritônio dos camundongos enquanto as mesoporfirinas não demonstraram a mesma capacidade de recrutar neutrófilos *in vivo*. (GRAF. 7A). Além disso, a mesoporfirina IX e a ferro-mesoporfirina IX diminuíram significativamente o recrutamento de células mononucleares e leucócitos totais para a cavidade peritoneal dos animais ( $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle). Estes resultados sugerem que o grupo vinil, presente na molécula das protoporfirinas, tem uma importância fundamental para o recrutamento de leucócitos.



**GRÁFICO 7 – As Mesoporfirinas não têm a capacidade de recrutar neutrófilos *in vivo*.** (A) Estrutura da Mesoporfirina IX e Fe-mesoporfirina IX. (B) número de neutrófilos; (C) células mononucleares e (D) leucócitos totais presentes no lavado peritoneal de camundongos injetados com heme, mesoporfirina IX, Fe-mesoporfirina IX, Pd-mesoporfirina IX (100µg/cavidade) ou salina, após um período de 4 horas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e são expressos como as médias + EPM do número de células encontradas no lavado peritoneal dos camundongos. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle.

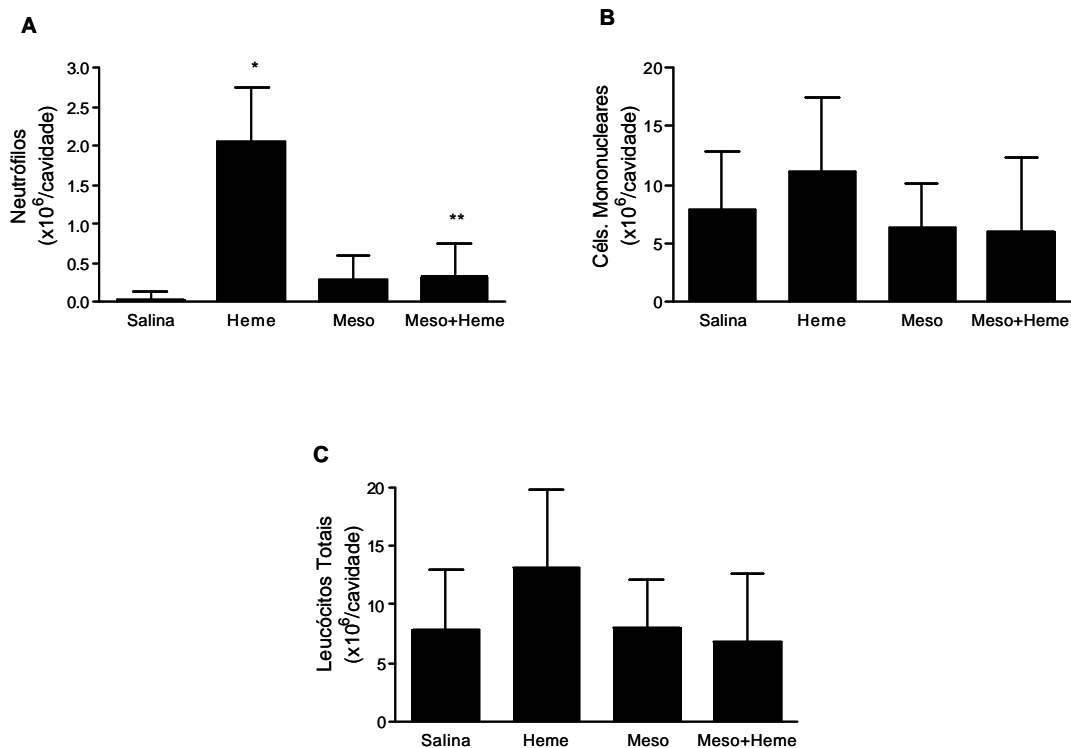
### **5.8. A Mesoporfirina IX antagoniza o efeito do heme sobre o recrutamento de neutrófilos in vivo.**

Os grupos vinis presentes na estrutura das protoporfirinas mostraram-se fundamentais para o recrutamento de leucócitos. A nossa hipótese é de que o heme induza a migração de neutrófilos através da ativação de um receptor. A semelhança do heme com as mesoporfirinas e a incapacidade destas moléculas de induzirem o recrutamento de neutrófilos nos levou a avaliar um potencial efeito antagonista destes análogos.

Camundongos foram injetados i.p. com heme (30µg/cavidade), mesoporfirina IX (100µg/cavidade), mesoporfirina IX (100µg/cavidade) + heme (30µg/cavidade) ou salina. Após 4 horas, as células recrutadas para a cavidade peritoneal foram contadas. Como era esperado, o heme induziu o recrutamento de neutrófilos ( $P=0,0011$  comparado ao grupo controle) (GRAF. 8A). Por outro lado, a mesoporfirina IX não foi capaz de induzir a migração de neutrófilos, mas foi capaz de antagonizar o efeito do heme sobre o recrutamento destas células ( $P=0,0006$  comparado ao grupo tratado somente com heme) (GRAF. 8A). O heme não induziu mudanças significativas no número de células mononucleares e leucócitos totais recrutados para o peritônio ( $P>0,05$  comparado ao grupo controle). Da mesma maneira, os animais tratados com mesoporfirina IX ou mesoporfirina IX + heme não sofreram mudanças significativas no número de células mononucleares e leucócitos totais recrutados para a cavidade peritoneal. Estes dados indicam que o grupamento vinil é importante para o efeito do heme sobre o recrutamento de



neutrófilos e que a mesoporfirina IX, por não apresentar o grupo vinil em sua estrutura, possui a capacidade de antagonizar o efeito do heme.



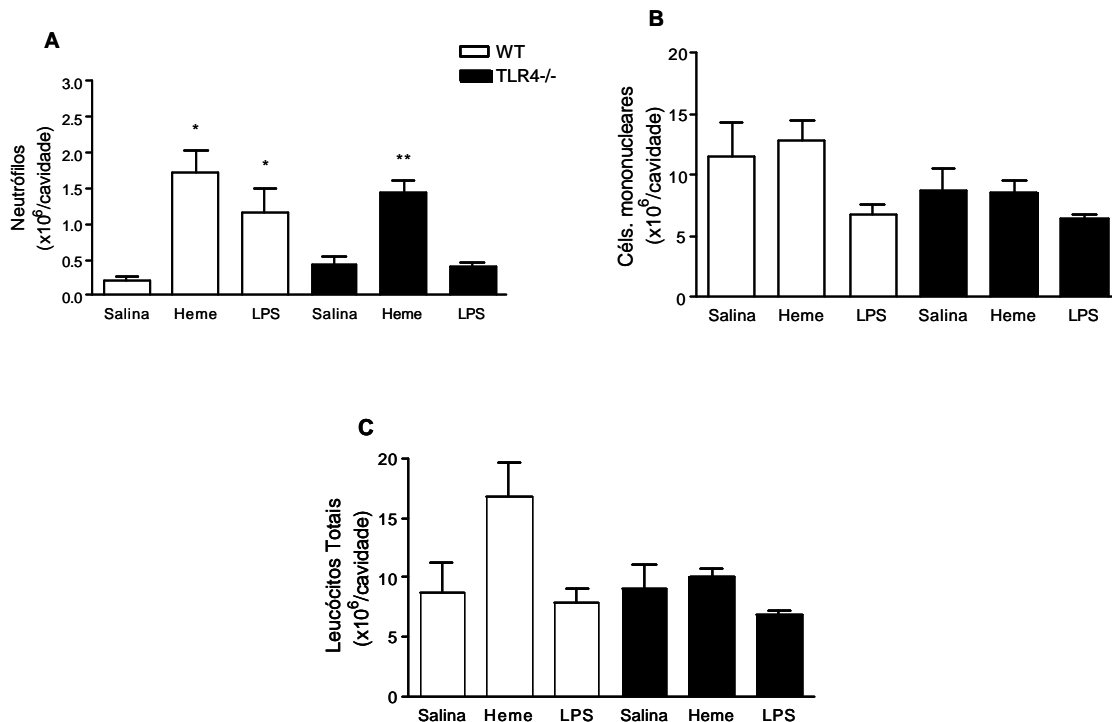
**GRÁFICO 8 – A Mesoporfirina antagoniza o efeito do heme sobre o recrutamento de neutrófilos *in vivo*.** Número de (A) neutrófilos; (B) células mononucleares e (C) leucócitos totais presentes no lavado peritoneal de camundongos injetados com heme, mesoporfirina, mesoporfirina IX + heme (100 $\mu$ g/cavidade) ou salina, após um período de 4 horas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e são expressos como as médias + EPM do número de células encontradas no lavado peritoneal dos camundongos. \* $P < 0,01$  em comparação ao grupo tratado com salina. \*\* $P < 0,001$  comparado ao grupo tratado com heme.

### **5.9. O recrutamento de neutrófilos induzido por heme não depende de TLR-4.**

Dados recentes obtidos em nosso laboratório (Figueiredo e Bozza, resultados não publicados) indicam que o heme tem a capacidade de ativar macrófagos e que este efeito é dependente da sua ligação ao TLR-4.

Com o objetivo de caracterizar o papel do TLR-4 no recrutamento de neutrófilos induzido por heme, os camundongos C57/BL10 ScCr, os quais apresentam uma deleção no gene *Tlr4* e não expressam o receptor TLR-4 (Poltorak *et al.*, 1998), receberam uma injeção i.p. de heme (60µg/cavidade), LPS (0.5µg/cavidade) ou salina. Como controle, os camundongos selvagens receberam os mesmos tratamentos. Após 4 horas, as células presentes no lavado peritoneal foram contadas. Como mostra o GRAF. 9A, o heme induziu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais selvagens ( $P=0,0079$  em comparação ao grupo controle). Este efeito também foi observado nos animais que não expressam o TLR-4 ( $P=0,0079$  quando comparado ao grupo controle). Como era esperado, o LPS foi capaz de recrutar neutrófilos para o peritônio dos animais selvagens ( $P=0,0079$  em comparação ao grupo controle), mas foi incapaz de induzir a migração destas células para o peritônio dos animais nocaute ( $P=0,5$  em comparação ao grupo controle). Por outro lado, tanto o heme quanto o LPS não foram capazes de estimular a migração de células mononucleares para as cavidades peritoneais de camundongos selvagens e nocaute (GRAF. 9B). Da mesma maneira, o heme e o LPS não foram capazes de induzir o recrutamento de

leucócitos totais para a cavidade peritoneal desses animais (GRAF. 9C). Estes dados sugerem que o heme tem a capacidade de estimular o recrutamento de neutrófilos *in vivo* de maneira independente do receptor TLR-4.



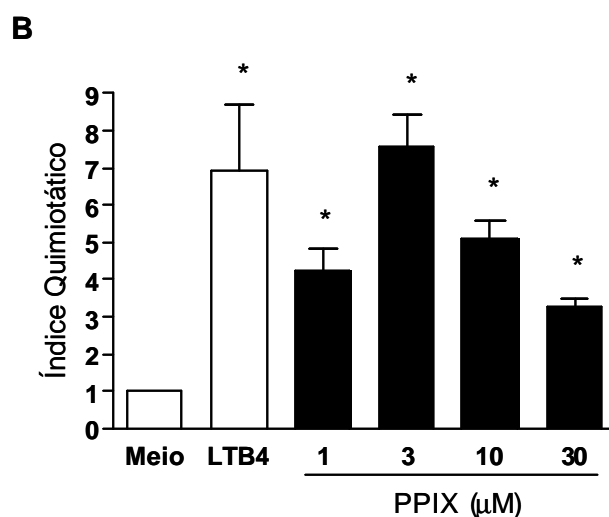
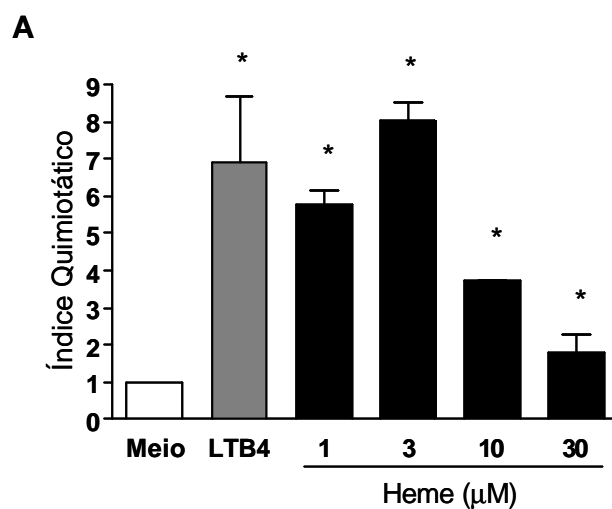
**GRÁFICO 9 – O recrutamento de neutrófilos induzido por heme não depende de TLR-4.** Número de (A) neutrófilos; (B) células mononucleares e (C) leucócitos totais presentes no lavado peritoneal de camundongos injetados com heme (60µg/cavidade), LPS (0,5µg/cavidade) ou salina, após um período de 4 horas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 para cada grupo de tratamento) e são expressos como as médias + EPM do número de células encontradas no lavado peritoneal destes camundongos. As barras brancas representam os animais selvagens e as barras pretas representam os animais TLR4<sup>-/-</sup>. \* $P=0,0079$  para heme e LPS, em relação ao grupo selvagem tratado com salina; \*\* $P=0,0079$  para heme, em relação ao grupo nocaute tratado com salina.

### **5.10. O Heme e a Protoporfirina IX induzem a migração de neutrófilos *in vitro*.**

Estudos recentes mostraram que o heme induz a migração de neutrófilos *in vitro* (Graça-Souza *et al.*, 2002). Com o objetivo de estabelecer o método de migração *in vitro*, nós inicialmente realizamos experimentos com o heme. Para isso, neutrófilos humanos foram purificados e incubados na presença ou ausência (migração randômica) de diferentes concentrações de heme (1, 3, 10 e 30 $\mu$ M) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas. Como controle positivo, os neutrófilos foram estimulados a migrar em direção a uma concentração de LTB<sub>4</sub> (10nM). Após o período de incubação, as células que migraram foram coletadas e contadas, e o índice quimiotático foi calculado conforme descrito na seção Materiais e Métodos. Como mostra o GRAF. 10A, o heme induz a migração de neutrófilos *in vitro*, de forma dependente de concentração, sendo já observada na concentração de 1 $\mu$ M. O efeito quimiotático foi máximo na concentração de 3 $\mu$ M, alcançando o nível de migração induzido pelo reconhecido agente quimiotático, LTB<sub>4</sub> (10nM). Estes resultados confirmam os dados da literatura (Graça-Souza *et al.*, 2002).

Como a PPIX demonstrou ser capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos *in vivo*, nós investigamos se ela também seria capaz de estimular diretamente o recrutamento de neutrófilos *in vitro*. A PPIX induziu a quimiotaxia de neutrófilos humanos, de forma semelhante ao heme e de maneira dependente de

concentração. O efeito quimiotático da PPIX sobre os neutrófilos também já é visto na concentração de  $1\mu\text{M}$ , sendo que a concentração ótima é  $3\mu\text{M}$  (GRAF. 10B).



**GRÁFICO 10 – O Heme e a Protoporfirina IX induzem a migração de neutrófilos *in vitro*.** Neutrófilos humanos foram incubados na presença ou ausência de diferentes concentrações de heme (1, 3, 10 e 30µM), PPIX (1, 3, 10 e 30µM) ou LTB<sub>4</sub> (10nM) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, por 2 horas. Após este período, as células que migraram foram coletadas e contadas em Câmara de Neubauer. O índice quimiotático foi calculado conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata e são expressos como a média + EPM dos neutrófilos que migraram em direção ao estímulo. \**P*<0,05 em comparação com o controle negativo (meio RPMI 1640 sozinho).

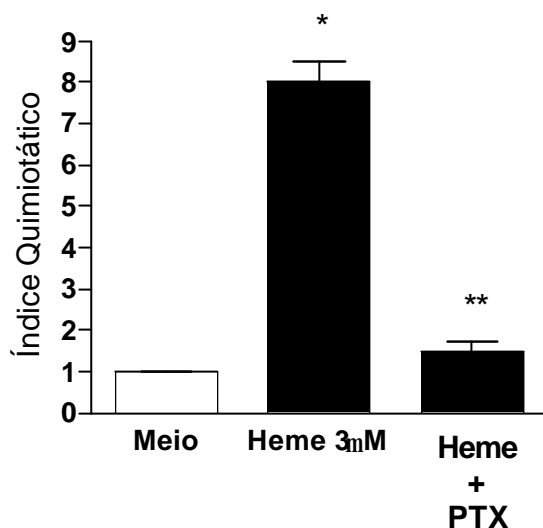


### **5.11. Efeito da Toxina Pertussis sobre a migração de neutrófilos *in vitro* induzida por heme.**

Com base nos dados que mostram um efeito quimiotático direto do heme sobre os neutrófilos, nós resolvemos investigar se esta molécula seria capaz de induzir a migração de neutrófilos através da ativação de um receptor quimiotático. Os receptores quimiotáticos são receptores com sete regiões transmembranares acoplados a proteínas G sensíveis à toxina Pertussis.

Os neutrófilos humanos foram purificados e pré-tratados com Toxina Pertussis (PTX) (100ng/mL) por 3 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, os neutrófilos foram estimulados a migrar em direção à concentração ótima de heme (3μM) por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle positivo, foi utilizada uma concentração de LTB<sub>4</sub> (10nM). O índice quimiotático foi calculado conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

Como apresentado no GRAF. 11, a concentração ótima de heme (3μM) foi capaz de induzir a migração de neutrófilos humanos ( $P < 0,05$  comparado ao controle negativo). Por outro lado, o pré-tratamento das células com PTX aboliu a migração dos neutrófilos induzida por heme ( $P < 0,05$  em comparação com as células estimuladas a migrar em direção ao heme). Estes dados indicam que o heme induz a migração de neutrófilos através da ativação de um receptor quimiotático, acoplado à proteína G. Assim, o heme pode funcionar como um fator quimiotático para neutrófilos, induzindo o recrutamento destas células durante a resposta inflamatória desencadeada por eventos hemolíticos e hemorrágicos.



**GRÁFICO 11 – Efeito da Toxina Pertussis sobre a migração de neutrófilos *in vitro* induzida por heme.** Neutrófilos humanos foram estimulados a migrar em direção a uma concentração de heme (3µM) por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> ou pré-tratados com PTX (100ng/mL) por 3 horas nas mesmas condições antes de serem estimulados a migrar em direção à concentração de heme. Após este período, as células que migraram foram coletadas e contadas em Câmara de Neubauer. O índice quimiotático foi calculado conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata e são expressos como a média + EPM dos neutrófilos que migraram em direção ao estímulo. \* $P < 0,05$  em comparação com o controle negativo; \*\* $P < 0,05$  em comparação ao heme.

## 6. DISCUSSÃO

Doenças como a anemia falciforme, anemia hemolítica, hemoglobinopatias, dengue e malária têm como característica a hemólise intra e extravascular elevada. A hemólise leva ao aparecimento de altas concentrações de heme livre. Estas desordens são freqüentemente associadas a um processo inflamatório com infiltração de leucócitos, que podem causar lesão tecidual (Wagener *et al.*, 2003). Neste trabalho, nós mostramos que o heme induz a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* e estimula a secreção de citocinas de forma dose-dependente. Sangue, hemoglobina e diversos análogos do heme apresentam uma capacidade semelhante em recrutar neutrófilos *in vivo*. Por outro lado, a biliverdina e as mesoporfirinas não são eficientes em recrutar neutrófilos e o tratamento com mesoporfirina *in vivo* inibe o efeito do heme sobre o recrutamento. Finalmente, o efeito quimiotático do heme foi revertido com o uso de toxina pertussis. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que o heme induza a quimiotaxia de neutrófilos através da ativação de um receptor acoplado a proteína G.

Nós observamos que a injeção intraperitoneal de sangue foi capaz de induzir peritonite em camundongos, com acúmulo de leucócitos, particularmente neutrófilos, na cavidade peritoneal dos animais. O efeito do sangue muito provavelmente foi mediado pela hemoglobina e/ou heme, uma vez que as injeções de hemoglobina e heme também se mostraram capazes de recrutar neutrófilos para o sítio inflamatório nestes animais. Além disso, diversos estudos têm

mostrado que a hemoglobina pode atuar como uma molécula pró-inflamatória. A hemoglobina é uma proteína ligadora de LPS, que aumenta sinergicamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS. Animais que recebem uma infusão i.v. de hemoglobina antes ou coincidente com uma injeção i.p. de LPS apresentam mortalidade acentuada (Su *et al.*, 1999). A injeção de hemoglobina em ratos aumenta a toxicidade letal da peritonite causada por *E. coli*, diminuindo a viabilidade dos fagócitos e aumentando o crescimento da bactéria (Yoo *et al.*, 1999). Por outro lado, a globina purificada da hemoglobina humana apresenta um efeito oposto ao da hemoglobina, ou seja, a globina inibe completamente a liberação de TNF induzida por LPS em macrófagos (Yang *et al.*, 2002). Em adição, a globina neutraliza as ações biológicas do LPS *in vivo*, conferindo proteção contra a letalidade do CLP (perfuração e ligação cecal), um modelo de infecção intra-abdominal (Yang *et al.*, 2002). O conjunto destes dados indica que o heme presente na hemoglobina aumenta a resposta inflamatória ao LPS, enquanto a globina inibe. Estes resultados são coerentes com os nossos dados, os quais mostram que a injeção i.p. de heme foi capaz de induzir peritonite aguda em camundongos, o que sugere uma possível ação direta desta molécula sobre o recrutamento e a ativação de leucócitos durante eventos hemolíticos e hemorrágicos.

O efeito do heme sobre o recrutamento de leucócitos mostrou-se seletivo, uma vez que o heme induziu o recrutamento de neutrófilos de maneira dose-dependente, mas não induziu mudanças significativas no número de outras populações de leucócitos encontradas no lavado peritoneal, como células mononucleares. Este resultado é corroborado por um estudo recente que mostra

que a injeção intratorácica de heme em ratos induziu uma reação inflamatória intensa, caracterizada pela formação de edema e acúmulo de neutrófilos nas cavidades pleurais destes animais (Graça-Souza *et al.*, 2002). De fato, este estudo foi um dos alicerces para a formulação das hipóteses e para a realização desta tese.

A expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumenta no pulmão depois de hemorragia, e essa alteração contribui para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (Le Tulzo *et al.*, 1997). Nós investigamos se o heme seria capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias no sítio de injúria. De fato, o heme induziu a secreção de TNF- $\alpha$  na cavidade peritoneal de camundongos após um período de 90 minutos. A ligação do TNF- $\alpha$  a seu receptor na superfície de neutrófilos induz a ativação e a expressão de integrinas, a secreção de mediadores inflamatórios e a liberação do conteúdo granular (Wagner e Roth, 2000). Este efeito do TNF- $\alpha$  sobre os neutrófilos poderia ajudar a perpetuar a resposta inflamatória.

A metemoglobina é a hemoglobina na qual o ferro do heme é oxidado a Fe<sup>+3</sup> e não funciona como proteína transportadora de oxigênio (Bradberry *et al.*, 2001). Recentemente foi demonstrado que a metemoglobina induz a produção de IL-6 e IL-8 por células endoteliais vasculares. Este efeito é dependente da ativação de NF- $\kappa$ B, sugerindo que a metemoglobina possui efeitos pró-inflamatórios e pode ter uma importância clínica em processos infecciosos e hemolíticos (Liu e Spolarics, 2003). Além disso, o próprio heme induz um aumento na síntese de  $\alpha$ -2 macroglobulina em modelos de inflamação local (Lyoumi *et al.*,

1999), o que sugere um papel para o heme na produção de proteínas de fase aguda. Isto está de acordo com o nosso resultado, que mostra que o heme induz a produção de IL-6 *in vivo*, após um período relativamente curto de exposição (90 minutos). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica e desempenha um papel importante na regulação da resposta imune e inflamatória. A produção acentuada de IL-6 está envolvida na patogênese de diversas doenças inflamatórias, podendo causar leucocitose, trombocitose, etc (Nishimoto e Kishimoto, 2004). Assim, a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  induzida pelo heme pode levar a uma amplificação da resposta inflamatória no sítio de injúria, com aumento no número de leucócitos recrutados, aumento na síntese de proteínas de fase aguda e mediadores inflamatórios. É importante observar que as doses de heme necessárias para o recrutamento de neutrófilos são menores que aquelas requeridas para indução de IL-6 e TNF- $\alpha$ .

A proteína quinase C (PKC) constitui uma família de enzimas que fosforilam resíduos de serina e de treonina. A PKC possui um papel biológico muito importante, que reflete múltiplas vias de sinalização que levam à geração de seu ativador, diacilglicerol (DAG). Sinais que ativam receptores membros da família GPCR podem causar a produção de DAG pela ativação de fosfolipases C específicas ou fosfolipase D, que geram ácido fosfatídico e então DAG; desta forma, a PKC está diretamente envolvida na ativação e migração de neutrófilos durante a resposta inflamatória (Newton, 1995). Graça-Souza e colaboradores mostraram que a migração de neutrófilos induzida por heme é dependente da atividade da PKC. Por outro lado, a produção de IL-8 por neutrófilos induzida por heme é independente da ativação de PKC, já que a expressão desta quimiocina

não é revertida pelo inibidor da enzima, sugerindo que o heme pode estar envolvido na regulação de diversas vias de sinalização (Graça-Souza *et al.*, 2002). Além disso, dados do nosso laboratório mostram que a produção de TNF- $\alpha$  induzida por heme é dependente do receptor TLR-4 (Figueiredo e Bozza, manuscrito em preparação). É possível, portanto, que a produção de IL-8 induzida pelo heme em neutrófilos também possa depender da ativação do TLR-4.

Nós investigamos se a migração de neutrófilos induzida por heme seria dependente do TLR-4 e, portanto, dependente da produção de citocinas inflamatórias. Para isso, utilizamos camundongos geneticamente deficientes deste receptor e observamos que a migração de neutrófilos induzida por heme ocorre independentemente da presença do TLR-4, já que o recrutamento de neutrófilos para o peritônio destes animais continuou sendo observado. Assim, parece que o heme é capaz de ligar em receptores diferentes levando a efeitos biológicos múltiplos.

Resultados de nosso laboratório mostram que moléculas análogas ao heme não são capazes de ativar os macrófagos levando a secreção de TNF (Figueiredo e Bozza, dados não publicados). Além de não apresentar efeito agonista, a protoporfirina IX demonstrou ser capaz de antagonizar o efeito do heme sobre estas células, ou seja, inibindo a produção de TNF- $\alpha$  induzida pelo heme. Estes resultados sugerem que o íon ferro é essencial para a ativação de macrófagos por heme. Estes dados são corroborados por experimentos que mostram que moléculas que possuem outros íons metálicos ligados aos anéis porfirínicos, como a estanho-protoporfirina IX e a paládio-protoporfirina IX, também não são capazes

da induzir a secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos murinos. Tais moléculas também antagonizam o efeito do heme sobre os macrófagos (Figueiredo e Bozza, resultados não publicados). Nós investigamos se a protoporfirina IX seria capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Pudemos observar que, quando injetada intraperitonealmente, a protoporfirina IX estimula o recrutamento de neutrófilos para o peritônio dos animais, de maneira dependente de dose. Então, nós hipotetizamos que, diferente do mecanismo de ativação de macrófagos por heme *in vitro*, que requer a presença do íon ferro, o mecanismo de recrutamento de neutrófilos induzido por heme é independente de ferro. Esta hipótese foi confirmada por experimentos que mostram que a injeção i.p. de zinco-protoporfirina IX ou estanho-protoporfirina IX é capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos *in vivo*. Desta maneira, parece que outro motivo na estrutura das protoporfirinas é necessário para a indução do recrutamento de neutrófilos. O conjunto destes resultados indica que o efeito do heme e de seus análogos no recrutamento de neutrófilos é dissociado do efeito na ativação de macrófagos *in vitro* e na secreção de mediadores inflamatórios *in vitro*. Estes resultados sugerem que o receptor TLR-4 apresenta maior seletividade quanto à ativação pelo heme do que um suposto receptor quimiotático.

Para avaliar quais seriam as características na estrutura das porfirinas que seriam importantes para o recrutamento de neutrófilos, nós realizamos experimentos nos quais camundongos receberam uma injeção i.p. de biliverdina, bilirrubina, mesoporfirina IX, ferro-mesoporfirina IX ou paládio-mesoporfirina IX.



Os produtos da degradação do heme têm potentes efeitos antiinflamatórios. Em modelos de transplantes em animais, a administração de biliverdina diminui as respostas de linfócitos T, a infiltração de neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, através da inibição de fatores de transcrição, como NFAT e NF- $\kappa$ B (Yamashita *et al.*, 2004); (Nakao *et al.*, 2004). Em modelos de estresse oxidativo, a administração de bilirrubina parece ser citoprotetora (Dore *et al.*, 1999); (Clark *et al.*, 2000). Além disso, a bilirrubina atenua a ativação e a disfunção de células endoteliais vasculares (Kawamura *et al.*, 2005). Nossos experimentos mostram que a biliverdina não é capaz de recrutar neutrófilos *in vivo*, mas a bilirrubina demonstra capacidade de induzir a migração de neutrófilos para o peritônio dos animais. Parece, pelo menos no nosso modelo de peritonite aguda, que a biliverdina não possui um efeito agonista, não sendo capaz de induzir uma resposta inflamatória aguda, o que é coerente com a literatura. Por outro lado, ao contrário do que mostram estudos recentes, a bilirrubina desempenhou um papel inflamatório no nosso modelo de peritonite em camundongos. Isto pode ser devido a uma alta dose de bilirrubina administrada aos animais (100 $\mu$ g/cavidade). Entretanto, a biliverdina foi administrada na mesma dose e não apresentou qualquer efeito inflamatório. Os efeitos da biliverdina e da bilirrubina sobre o recrutamento de neutrófilos e seus papéis durante um processo inflamatório decorrente de eventos hemorrágicos merecem maiores estudos.

As mesoporfirinas apresentam uma diferença estrutural em relação às protoporfirinas. As mesoporfirinas apresentam grupos etilas no lugar dos grupos vinis que estão presentes na estrutura das protoporfirinas. Nestes experimentos,

nós pudemos observar que a mesoporfirina IX, ferro-mesoporfirina IX e paládio-mesoporfirina IX não foram capazes de induzir a migração de neutrófilos, o que sugere que o grupamento vinil é importante para o efeito do heme sobre o recrutamento de leucócitos.

A incapacidade das mesoporfirinas de induzirem a migração de leucócitos, apesar da semelhança com o heme, nos fez considerar a possibilidade de que elas poderiam atuar como antagonistas competitivos do heme. De fato, a injeção i.p. de mesoporfirina IX concomitantemente com a injeção i.p. de heme inibiu quase completamente o efeito do heme sobre o recrutamento de neutrófilos. Este fato vem reforçar a nossa hipótese de que o heme induza o recrutamento de leucócitos através da ativação de um receptor, já que demonstramos a existência de uma molécula antagonista do heme. Seria interessante avaliar o papel das mesoporfirinas em estados patológicos de hemólise acentuada ou durante hemorragia.

Graça-Souza e colaboradores demonstraram que o heme induz a migração de neutrófilos *in vitro* e este efeito é dependente da atividade da PKC (Graça-Souza *et al.*, 2002). Este fato sugere que o heme livre pode funcionar como um fator quimiotático liberado durante eventos hemolíticos e hemorrágicos. Como os fatores quimiotáticos e as quimiocinas induzem a migração de leucócitos através da ativação de receptores com sete regiões transmembranares e acoplados a proteínas G sensíveis a toxina Pertussis, nós resolvemos investigar se o pré-tratamento dos neutrófilos com toxina Pertussis seria capaz de inibir ou abolir a migração das células em direção a uma concentração de heme. De fato, quando os neutrófilos foram pré-tratados com toxina Pertussis e depois colocados frente a

uma concentração de heme, eles foram incapazes de migrar em direção ao heme. Dados do nosso laboratório mostram que a produção de ROS por neutrófilos induzida por heme não depende do TLR-4, mas depende de um receptor acoplado à proteína G sensível à toxina Pertussis, na medida em que o pré-tratamento das células com PTX diminuiu a produção de ROS. Por outro lado, a expressão de HO-1, a qual é estimulada por estresse oxidativo, hipóxia e citocinas pró-inflamatórias, dentre outros (Maines, 1997), não depende de TLR-4 nem da ativação de receptores acoplados à proteína G, sugerindo uma terceira via de sinalização estimulada pelo heme. A ativação do TLR-4 pelo LPS induz, além da produção de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , a produção de ROS, o recrutamento de leucócitos *in vivo*, a proliferação de esplenócitos e o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (Kaisho e Akira, 2004). Assim, parece que, diferente do LPS, que demonstra todos os seus efeitos biológicos através da ativação do TLR-4 (Poltorak *et al.*, 1998), o heme ativa múltiplas vias de sinalização, tornando o cenário mais complexo.

O heme é grupamento prostético da citocromo c e liga-se covalentemente à proteína por pontes tioéster, com resíduos de cisteína na proteína. O motivo de ligação do heme à citocromo c é o mais estudado entre as proteínas que apresentam heme como grupamento prostético e é constituído pelos resíduos CXXCH, onde X é um aminoácido qualquer. A formação das pontes tioéster entre os resíduos de cisteína na proteína e os grupos vinil do heme é quimicamente complexa e pouco compreendida, mas sabe-se que ela tem um papel importante (Daltrop *et al.*, 2002). Recentemente foi demonstrado que o heme se liga ao

segmento intracelular CXXCH de um canal de potássio (SLo1 BK) dependente de cálcio, inibindo a sua frequência de abertura (Tang *et al.*, 2003). Este motivo de ligação ao heme é idêntico ao motivo presente na citocromo c. Neste caso, o heme atuaria intracelularmente, mas as nossas evidências mostram que o heme atua de maneira dependente de receptor. Juntos, estes achados indicam que o heme é uma molécula sinalizadora, atuando na comunicação entre as células e através da ativação de um receptor. Por análise de seqüências, nós encontramos o motivo CXXCH, presente na citocromo c e no canal Slo1BK, em dois dos receptores para moléculas quimiotáticas expressos em neutrófilos, o BLT1 e o BLT2 (receptores de LTB<sub>4</sub>). No caso do BLT1, esta seqüência está localizada na borda externa do terceiro segmento transmembrana, enquanto no BLT2 está presente no quinto segmento externo. Devido a estas observações, nós hipotetizamos que o heme é um ligante dos receptores do LTB<sub>4</sub>. A incapacidade das mesoporfirinas induzirem o recrutamento de neutrófilos reforça a hipótese de que o grupamento vinil presente na estrutura das protoporfirinas seja essencial para a ligação das porfirinas ao motivo ligador de heme presente na citocromo c e nos receptores BLT1 e BLT2. Estudos estão em andamento com o objetivo de determinar a participação destes receptores na migração e na indução de ROS induzidas pelo heme em neutrófilos.

Em conclusão, os nossos dados vão de encontro ao paradigma de que o heme exerça a maioria de suas ações inflamatórias em função de suas características anfipática e pró-oxidante, que permitiriam o seu particionamento nas membranas plasmáticas e a ativação de vias de sinalização. Os resultados desta tese apontam para um papel do heme como mediador inflamatório capaz de

ativar leucócitos através da associação a receptores da imunidade inata presentes nestas células.

## 7. CONCLUSÕES

1. A injeção i.p. de sangue, hemoglobina e heme desencadeiam uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal de camundongos, como evidenciado pelo acúmulo de leucócitos, especialmente neutrófilos.
2. O efeito do heme é dependente de dose e seletivo, uma vez que foram observadas apenas mudanças no número de neutrófilos recrutados.
3. O heme induz a produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- $\alpha$ , *in vivo*.
4. A Protoporfirina IX induz o recrutamento de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*, de maneira dose-dependente, sugerindo que o recrutamento de neutrófilos não depende do íon ferro.
5. A Zinco-PPIX e a Estanho-PPIX induzem a migração de neutrófilos *in vivo*.
6. Os produtos da degradação do heme demonstram efeitos opostos sobre o recrutamento de neutrófilos: a biliverdina não induz a migração destas células, mas a bilirrubina recruta neutrófilos *in vivo*.
7. As mesoporfirinas não têm a capacidade de recrutar neutrófilos *in vivo*, devido à falta do grupamento vinil nas suas estruturas.
8. A Mesoporfirina IX atua como antagonista do heme, com relação ao recrutamento de neutrófilos.

9. O recrutamento de neutrófilos induzido por heme é independente do receptor TLR-4.
10. A migração de neutrófilos *in vitro* induzida por heme depende da ativação de receptores acoplados à proteína G.

Os resultados desta tese apontam o heme como um mediador pró-inflamatório liberado durante a resposta inflamatória desencadeada por eventos hemolíticos e hemorrágicos capaz de ativar leucócitos através da ligação a receptores quimiotáticos, acoplados à proteína G.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akira, S e K Takeda. TollHike receptor signalling. Nature Rev Immunol, v.4, p.499-511. 2004.
- Ali, H, B Haribabu, Rm Richardson e R Snyderman. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. Med Clin North Am, v.81, n.1, Jan, p.1-28. 1997.
- Arruda, M, A Rossi, M Freitas, C Barja-Fidalgo e A Graça-Souza. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-κB. J Immunol, v.173, p.2023-2030. 2004.
- Au, B, M Teixeira, P Collins e T Williams. Blockade of PAF receptors controls IL-8 production by regulating the activation of neutrophil CD11/CD18. Eur J Pharmacol, v.425, p.65-71. 2001.
- Balla, J, G Balla, V Jeney, G Kakuk, H Jacob e G Vercellotti. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. Blood, v.95, p.3442-3450. 2000.
- Balla, J, H Jacob, G Balla, K Nath, J Eaton e G Vercellotti. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. Proc Natl Acad Sci USA, v.90, p.9285-9289. 1993.
- Barnes, P, K Chung e C Page. Inflammatory mediators of asthma: an update. Pharmacol Rev, v.50, n.4, p.515-596. 1998.
- Bishop, A e A Hall. Rho GTPases and their effector proteins. Biochem J, v.348, p.241-255. 2000.
- Bradberry, S, T-C Aw, N Williams e J Vale. Occupational Methaemoglobinaemia. Occup. Environ. Med., v.58, p.611-616. 2001.
- Brink, C, S-E Dáhlen, J Drazen, J Evans, D Hay, S Nicosia, C Serhan, T Shimizu e T Yokomizo. International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. Pharmacol Rev, v.55, n.1, p.195-227. 2003.
- Chapman, J, L Otterbein, J Elias e A Choi. Carbon monoxide attenuates aeroallergen-induced inflammation in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.281, p.L209-L216. 2001.



Cicchetti, G, P Allen e M Glogauer. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. Crit Rev Oral Biol Med, v.13, n.3, p.220-228. 2002.

Clark, J, R Foresti, C Green e R Motterlini. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. Biochem J, v.348, p.615-619. 2000.

Dalpiaz, A, S Spisani, C Biondi, E Fabbri, M Nalli e M Ferretti. Studies on human neutrophil biological functions by means of formyl-peptide receptor agonists and antagonists. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, v.3, n.1, p.33-42. 2003.

Daltrop, O, J Allen, A Willis e S Ferguson. *In vitro* formation of a c-type cytochrome. Proc Natl Acad Sci USA, v.99, n.12, p.7872-7876. 2002.

Delanghe, J e M Langlois. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. Clin Chim Acta, v.312, p.13-23. 2001.

Dore, S, M Takahashi, C Ferris, R Zakhary, L Hester, D Guastella e S Snyder. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. Proc Natl Acad Sci USA, v.96, p.2445-2450. 1999.

Edens, H e C Parkos. Neutrophil transendothelial migration and alteration in vascular permeability: focus on neutrophil-derived azurocidin. Curr Opin Hematol, v.10, n.1, p.25-30. 2003.

Graça-Souza, A, M Arruda, M Freitas, C Barja-Fidalgo e P Oliveira. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. Blood, v.99, p.4160-4165. 2002.

Horvath, I, S Loukides, T Wodehouse, S Kharitonov, P Cole e P Barnes. Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress. Thorax, v.53, p.867-870. 1998.

Inohara, N e G Nuñez. NODs: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. Nature Rev Immunol, v.3, p.371-382. 2003.

Jeney, V, J Balla, A Yachie, Z Varga, G Vercellotti, J Eaton e G Balla. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. Blood, v.100, p.879-887. 2002.

Kaisho, T e S Akira. Pleiotropic function of Toll-like receptors. Microbes Infect, v.6, n.15, p.1388-1394. 2004.

Katanaev, V. Signal transduction in neutrophil chemotaxis. Biochemistry, v.66, n.4, p.351-368. 2001.

Kawamura, K, K Ishikawa, Y Wada, S Kimura, H Matsumoto, T Kohro, H Itabe, T Kodama e Y Maruyama. Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.25, n.1, p.155-160. 2005.

Kristiansen, M, J Graversen, C Jacobsen, O Sonne, H-J Hoffman, S Law e S Moestrup. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature, v.409, p.198-201. 2001.

Kuhns, D, E Nelson, W Alvord e J Gallin. Fibrinogen induces IL-8 synthesis in human neutrophils stimulated with Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine or Leukotriene B<sub>4</sub>. J Immunol, v.167, p.2869-2878. 2001.

Le Tulzo, Y, R Shenkar, D Kaneko, P Moine, G Fantuzzi, C Dinarello e E Abraham. Hemorrhage increases cytokine expression in lung mononuclear cells in mice: involvement of catecholamines in nuclear factor-κB regulation and cytokine expression. J Clin Invest, v.99, p.1516-1524. 1997.

Le, Y, P Murphy e J Wang. Formyl-peptide receptors revisited. Trends Immunol, v.23, n.11, p.541-548. 2002.

Lee, T-S e L-Y Chau. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. Nat Med, v.8, n.3, p.240-246. 2002.

Lee, Y, B Hybertson, H Cho e J Repine. Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. J Lab Clin Med, v.140, p.312-319. 2002.

Lim, Y, A Jenner, A Ali, Y Wang, Si-H Hsu, S Chong, H Bauman, B Halliwell e S-K Lim. Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. Kidney Int, v.58, p.1033-1044. 2000.

Liu, X e Z Spolarics. Methemoglobin is a potent activator of endothelial cells by stimulating IL-6 and IL-8 production and E-selectin membrane expression. Am J Physiol Cell Physiol, v.285, n.5, p.C1036-C1046. 2003.

Lyouni, S, H Puy, F Tamion, C Bogard, A Leplingard, M Scotte, R Vranckx, F Gauthier, M Hiron, M Daveau, Y Nordmann, Jc Deybach e Jp Lebreton. Heme and acute inflammation role in vivo of heme in the hepatic expression of positive acute-phase reactants in rats. Eur J Biochem, v.261, n.1, Apr, p.190-196. 1999.

Maines, M. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.37, p.517-554. 1997.

Moestrup, S e H Moller. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. Ann Med, v.36, n.5, p.347-354. 2004.

Muller, W. Leukocyte-endothelial cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. Trends Immunol, v.24, n.6, p.326-333. 2003.

Nakao, A, L Otterbein, M Overhaus, J Sarady, A Tsung, K Kimizuka, M Nalesnik, T Kaizu, T Uchiyama, F Liu, N Murase, A Bauer e F Bach. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. Gastroenterology, v.127, n.2, p.595-606. 2004.

Nath, K, J Haggard, A Croatt, J Grande, K Poss e J Alam. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. Am J Pathol, v.156, p.1527-1535. 2000.

Nathan, C. Points of control in inflammation. Nature, v.420, n.6917, p.846-852. 2002.

Newton, A. Protein kinase C: structure, function, and regulation. J Biol Chem, v.270, n.48, p.28495-28498. 1995.

Niggli, V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. Int J Biochem Cell Biol, v.35, n.12, p.1619-1638. 2003.

Nishimoto, N e T Kishimoto. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. Curr Opin Pharmacol, v.4, p.386-391. 2004.

Otterbein, L, F Bach, J Alam, M Soares, H Lu, M Wysk, R Davis, R Flavell e A Choi. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. Nat Med, v.6, n.4, p.422-428. 2000.

Otterbein, L, M Soares, K Yamashita e F Bach. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. Trends Immunol, v.24, n.8, p.449-455. 2003.

Pease, J e I Sabroe. The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. Am J Respir Med, v.1, n.1, p.19-25. 2002.

Pettit, E e F Fay. Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. Physiol Rev, v.78, n.4, p.949-967. 1998.

Poltorak, A, X He, I Smirnova, M-Y Liu, C Van Huffel, X Du, D Birdwell, E Alejos, M Silva, C Galanos, M Freudenberg, P Ricciardi-Castagnoli, B Layton e B Beutler. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. Science, v.282, p.2085-2088. 1998.

Ponka, P. Cell biology of heme. Am J Med Sci, v.318, p.241-256. 1999.

Poss, K e S Tonegawa. Heme oxygenase-1 is required for mammalian iron reutilization. Proc Natl Acad Sci USA, v.94, p.10919-10924. 1997.

Prescott, S, G Zimmerman, D Stafforini e T McIntyre. Platelet-Activating Factor and related lipid mediators. Annu Rev Biochem, v.69, p.419-445. 2000.

Rollins, B. Chemokines. Blood, v.90, n.3, p.909-928. 1997.

Rose, J, J Foley, P Murphy e S Venkatesan. On the mechanism and significance of ligand-induced internalization of human neutrophil chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. J Biol Chem, v.279, n.23, p.24372-24386. 2004.

Rossi, D e A Zlotnik. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol, v.18, p.217-242. 2000.

Rot, A e U Von Andrian. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. Annu Rev Immunol, v.22, p.891-928. 2004.

Sassa, S. Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IXalpha, carbon monoxide? Antioxid Redox Signal, v.6, n.5, p.819-824. 2004.

Shibata, F, K Konishi e H Nakagawa. Chemokine receptor CXCR2 activates distinct pathways for chemotaxis and calcium mobilization. Biol Pharm Bull, v.25, n.9, p.1217-1219. 2002.

Shiu, Y-T, M Udden e L McIntire. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. Blood, v.95, p.3232-3241. 2000.

Sikorski, E, T Hock, N Hill-Kapturczak e A Agarwal. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. Am J Physiol Renal Physiol, v.286, n.3, p.F425-F441. 2004.

Soares, M, M Seldon, I Gregoire, T Vassilevskaia, P Berberat, J Yu, T-Y Tsui e F Bach. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. J Immunol, v.172, p.3553-3563. 2004.

Su, D, R Roth e J Levin. Hemoglobin infusion augments the tumor necrosis factor response to bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) in mice. Crit Care Med, v.27, n.4, p.771-778. 1999.

Tager, A e A Luster. BLT1 and BLT2: the leukotriene B<sub>4</sub> receptors. Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids, v.69, p.123-134. 2003.

Tang, X, R Xu, M Reynolds, M Garcia, S Heinemann e T Hoshi. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1BK channels. Nature, v.425, p.531-535. 2003.

Tolosano, E, S Fagoonee, E Hirsch, F Berger, H Baumann, L Silengo e F Altruda. Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin/hemopexin double-null mice after acute hemolysis. Blood, v.100, p.4201-4208. 2002.

Tolosano, E, E Hirsch, E Patrucco, C Camaschella, R Navone, L Silengo e F Altruda. Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice. Blood, v.94, n.11, p.3906-3914. 1999.

Turhan, A, L Weiss, N Mohandas, B Coller e P Frenette. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. Proc Natl Acad Sci USA, v.99, n.5, p.3047-3051. 2002.

Vachharajani, T, J Work, A Issekutz e D Granger. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.278, p.H1613-H1617. 2000.

Van Buul, J e P Hordijk. Signaling in leukocyte transendothelial migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.24, p.1-11. 2004.

Vicente, A, M Guillén e M Alcaraz. Participation of heme oxygenase-1 in a model of acute inflammation. Exp Biol Med, v.228, p.514-516. 2003.

Vicente-Manzanares, M e F Sánchez-Madrid. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. Nature Rev Immunol, v.4, p.110-122. 2004.

Wagener, F, N Abraham, Y Van Kooyk, T De Witte e C Figdor. Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. Trends Pharmacol Sci, v.22, n.2, p.52-54. 2001a.

Wagener, F, J Da Silva, T Farley, T De Witte, A Kappas e N Abraham. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediated endothelial ICAM-1 expression. J Pharmacol Exp Ther, v.291, p.416-423. 1999.

Wagener, F, A Eggert, O Boerman, W Oyen, A Verhofstad, N Abraham, G Adema, Y Van Kooyk, T De Witte e C Figdor. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. Blood, v.98, p.1802-1811. 2001b.

Wagener, F, E Feldman, T De Witte e N Abraham. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in vascular endothelial cells. Proc Soc Exp Biol Med, v.216, n.456-463. 1997.

Wagener, F, H-D Volk, D Willis, N Abraham, M Soares, G Adema e C Figdor. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. Pharmacol Rev, v.55, p.551-571. 2003.

Wagner, J e R Roth. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. Pharmacol Rev, v.52, p.349-374. 2000.

- Wang, W, D Smith e S Zucker. Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats. Hepatology, v.40, n.2, p.424-433. 2004.
- Ward, P. The dark side of C5a in sepsis. Nature Rev Immunol, v.4, p.133-142. 2004.
- Ward, S. Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? Trends Immunol, v.25, n.2, p.67-74. 2004.
- Willis, D, A Moore, R Frederick e D Willoughby. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. Nat Med, v.2, p.87-90. 1996.
- Yachie, A, Y Niida, T Wada, N Igarashi, H Kaneda, T Toma, K Ohta, Y Kasahara e S Koizumi. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. J Clin Investig, v.103, p.129-135. 1999.
- Yamashita, K, J Mcdaid, R Öllinger, T-Y Tsui, P Berberat, A Usheva, E Csizmadia, R Smith, M Soares e F Bach. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. FASEB J, v.18, n.6, p.765-767. 2004.
- Yang, H, H Wang, T Bernik, S Ivanova, H Wang, L Ulloa, J Roth, J Eaton e K Tracey. Globin attenuates the innate immune response to endotoxin. Shock, v.17, n.6, p.485-490. 2002.
- Yokomizo, T, T Izumi, K Chang, Y Takuwa e T Shimizu. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. Nature, v.387, p.620-624. 1997.
- Yokomizo, T, K Kato, K Terawaki, T Izumi e T Shimizu. A second leukotriene B<sub>4</sub> receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. J Exp Med, v.192, n.7, p.421-431. 2000a.
- Yokomizo, T, K Masuda, K Kato, A Toda, T Izumi e T Shimizu. Leukotriene B<sub>4</sub> receptor - Cloning and intracellular signaling. Am J Respir Crit Care Med, v.161, p.S51-S55. 2000b.
- Yoo, Y-M, K-M Kim, S-S Kim, J Han, H-Z Lea e Y Kim. Hemoglobin toxicity in experimental bacterial peritonitis is due to production of reactive oxygen species. Clin Diag Lab Immunol, v.6, n.6, p.938-945. 1999.