



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O PAPEL DO HEME NA INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS POR *Leishmania chagasi*.

Graziele Quintela de Carvalho

Salvador-Bahia-Brasil

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

O PAPEL DO HEME NA INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS POR *Leishmania chagasi*.

Grazielle Quintela de Carvalho

Orientador: Dra. Valéria de Matos Borges

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós Graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre

Salvador-Bahia-Brasil

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C331p Carvalho, Grazielle Quintela de
O papel do heme na infecção de neutrófilos humanos por *Leishmania*
chagasi. [manuscrito] / Grazielle Quintela de Carvalho.- 2013.
61 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisa Gonçalo
Moniz. Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, 2013.
Orientador: Dr^a. Valéria de Matos Borges.

1. Leishmaniose Visceral 2. *Leishmania chagasi* 3. Heme 4. Neutrófilo I. Título

CDU 616.993.161

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me presentear com a vida que tenho;

Aos meus pais (Selma e Antonio), pelo amor, dedicação e sacrifícios. Todas as minhas conquistas são dedicadas a vocês;

Ao meu irmão (João) e aos meus familiares, pelo carinho e apoio;

Ao meu namorado (Thiago), companheiro em todos os momentos, pela paciência e incentivos;

Aos amigos, pelas conversas, desabafos e “distrações”;

A minha orientadora (Valéria Borges), pela confiança, oportunidade e comprometimento. Agradeço por me guiar durante esse trabalho com muita competência;

A Nívea, pelos ensinamentos e colaborações desde a iniciação científica até o momento;

As meninas neutrofílicas, principalmente Martha e Natália, por ajudarem nos experimentos e discussões;

Aos colegas do laboratório, pelo convívio e por sempre se mostrarem solícitos;

Aos pesquisadores LIMI-LIP pelas contribuições;

Aos Técnicos e Secretárias LIMI-LIP;

Ao CPqGM e seus funcionários e ao CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO.....	10
Aspectos gerais sobre a Leishmaniose Visceral	10
Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp	11
Neutrófilos: características gerais	12
Neutrófilos e infecção por <i>Leishmania</i> sp	14
O grupamento heme.....	15
Relação entre heme e neutrófilos.....	18
JUSTIFICATIVA	21
HIPÓTESE	22
OBJETIVOS	22
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
DESENHO EXPERIMENTAL.....	23
Avaliação dos mediadores	23
Avaliação da sobrevivência e da carga parasitária.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS	30
Ativação de neutrófilos humanos infectados com <i>L. chagasi</i> em presença do heme..	30

Produção de ROS durante a interação de neutrófilos infectados com <i>L. chagasi</i> e heme	31
Detecção de LTB ₄ em neutrófilos humanos infectados com <i>L. chagasi</i> em presença do heme	32
Efeito do heme na sobrevivência de neutrófilos humanos durante a infecção por <i>L. chagasi</i>	33
Efeito do heme na carga parasitária de neutrófilos humanos por <i>L. chagasi</i>	35
Papel das moléculas associadas ao heme na replicação de <i>L. chagasi</i> em neutrófilos humanos	36
Ativação das enzimas neutrofílicas pela presença de moléculas associadas ao heme durante a infecção por <i>L. chagasi</i>	37
Indução da resposta anti-inflamatória via TGF- β nos neutrófilos infectados com <i>L. chagasi</i> em presença do heme	38
Ativação de mecanismos anti-oxidativos em neutrófilos humanos durante a infecção por <i>L. chagasi</i> em presença do heme	39
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	50
Conclusão geral.....	50
REFERÊNCIAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD 7-Amino-actinomicina D

ANOVA Análise de variância

DETC Dietilditiocarbamato

DHE “*Dihydroethidium*”

EIA Ensaio imunoenzimático, do inglês “*Enzyme immunoassay*”

ELISA Ensaio imunoenzimático, do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”

HE Hematoxilina-eosina

HO Heme-oxigenase

IL-8 Interleucina-8

LTB₄ Leucotrieno B₄

MMP-9 Metaloproteinase-9

MPO Mieloperoxidase

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

NE Elastase neutrofílica

NET “*Neutrophils Extracellular Traps*”

Nramp1 Proteína 1 do macrófago associada a resistência natural, do inglês “*Natural resistance associated macrophage protein 1*”

PGE₂ Prostaglandina E₂

PPIX Protoporfirina IX

ROS Espécies reativas de oxigênio, do inglês “*Reactive oxygen species*”

SBF Soro bovino fetal

SOD Superóxido dismutase

TGF- β Fator transformante de crescimento, do inglês “*Transforming growth factor β* ”

TNF Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

Figura 2: Estrutura química de formas variantes do heme.

Figura 3: Síntese do heme.

Figura 4: Efeito do heme sobre as enzimas neutrofílicas durante a infecção por *L. chagasi*.

Figura 5: A presença do heme induz estresse oxidativo em neutrófilos infectados com *L. chagasi*.

Figura 6: Neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* aumentam a liberação de LTB_4 em presença do heme.

Figura 7: Heme induz morte celular em neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi*.

Figura 8: Heme não interfere na infecção por *L. chagasi*, mas favorece a viabilidade do parasita em neutrófilos humanos.

Figura 9: A PPIX e o Fe^{+2} também contribuem para proliferação da *L. chagasi* em neutrófilos humanos.

Figura 10: A presença da PPIX ou do Fe^{+2} não interfere na atividade da MPO ou da NE.

Figura 11: O heme induz produção do mediador anti-inflamatório TGF- β em neutrófilos infectados com *L. chagasi*.

Figura 12: Neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* aumentam atividade da SOD em presença de heme ou de Fe^{+2} .

Figura 13: A inibição da SOD pelo DETC diminui a replicação da *L. chagasi* em neutrófilos humanos, mesmo em presença do heme.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, sendo endêmica em muitas áreas. A doença pode apresentar diferentes manifestações clínicas, tais como a Leishmaniose Visceral (LV), que é a forma mais grave e letal, caso não seja tratada. As manifestações hematológicas são comumente associadas à LV, onde os mecanismos relacionados à hemólise e a presença do heme livre, podem interferir no comportamento de neutrófilos. Já foi descrito que o heme livre é uma molécula pró-inflamatória, com a capacidade de induzir migração e ativação dos neutrófilos. No entanto, o efeito do heme sobre neutrófilos humanos durante a infecção por *Leishmania chagasi*, ainda não foi explorado. A nossa hipótese é que o heme induz ativação de neutrófilos humanos favorecendo o processo inflamatório na infecção por *L. chagasi*. Nossos resultados mostraram que o heme induz a ativação e apoptose em neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi*, seguido pela sobrevivência do parasita. Moléculas presentes na composição do heme, como a protoporfirina IX (PPIX) e o Fe^{+2} , não alteram o status de ativação dos neutrófilos, mas mantêm o aumento do crescimento parasitário como observado em presença do heme. Além disso, o heme e o Fe^{+2} aumentam a produção do TGF- β e a atividade da SOD. A inibição farmacológica da enzima SOD com dietilditiocarbamato (DETC) reduz a taxa de proliferação da *L. chagasi* em neutrófilos infectados. Em conjunto, esses dados indicam que o heme e o Fe^{+2} podem contribuir como fonte nutricional e controlar o ambiente inflamatório, com a indução de TGF- β e SOD, permitindo a sobrevivência da *L. chagasi* em neutrófilos humanos. Esse estudo poderá abrir novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos imunopatogênicos envolvendo neutrófilos e suas implicações no processo inflamatório da LV.

Palavras-chaves: 1. Leishmaniose Visceral; 2. *Leishmania chagasi*; 3. Heme; 4. Neutrófilo.

ABSTRACT

The Leishmaniasis is a disease that affects millions of people worldwide, being endemic in many areas. The disease may present different clinical manifestations, such as Visceral Leishmaniasis (VL), which is the most severe form and fatal if left untreated. The hematologic manifestations are commonly associated with VL, where the mechanisms related to hemolysis and the presence of free heme may modify the behavior of neutrophils. It has been reported that the free heme is a pro-inflammatory molecule with the ability to induce migration and activation of neutrophils. However, the effect of the heme on human neutrophils during infection by *Leishmania chagasi* yet hasn't been explored. Our hypothesis is that the heme induces activation of human neutrophils favoring the inflammatory process on the infection by *L. chagasi*. The results showed that the heme induces activation and apoptosis in human neutrophils infected with *L. chagasi*, followed by parasite survival. Molecules present in the composition of heme, as protoporphirin IX (PPIX) and Fe^{+2} , do not alter the activation status of neutrophils, but maintain the increased parasite growth as viewed in the presence of heme. Furthermore, the heme and Fe^{+2} increase the production of TGF- β and SOD activity. The pharmacological inhibition of SOD with diethyldithiocarbamate (DETC) reduces the rate of *L. chagasi* proliferation in infected neutrophils. Together, these data indicate that the heme and Fe^{+2} may contribute as a nutritional source and control the inflammatory environment with the induction of TGF- β and SOD, allowing the survival of the *L. chagasi* in human neutrophils. This study may open new perspectives for the understanding of the immunopathogenic mechanisms involving neutrophils and its implications in the inflammatory process of the VL.

Key-words: 1. Visceral Leishmaniasis; 2. *Leishmania chagasi*; 3. Heme; 4. Neutrophil.

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais sobre a Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose é uma doença causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* (WHO, 2002). A Organização Mundial de Saúde tem classificado a Leishmaniose como uma doença emergente e negligenciada, e estima que a infecção resulte em 2 milhões de novos casos por ano. São 88 países considerados endêmicos, com 12 milhões de indivíduos infectados e cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença (KEDZIERSKI, 2011).

As Leishmanioses apresentam-se sob diversas manifestações clínicas que variam entre formas: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) (TULADHAR et al., 2011). A LV é a forma mais grave, causada principalmente pela infecção por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (KAYE & AEBISCHER, 2011).

Os sinais e sintomas da LV são apresentados após um período de incubação de 2 a 6 semanas de infecção, consistindo de invasão parasitária principalmente do baço, fígado e medula óssea, associados à esplenomegalia, hepatomegalia, febre e perda de peso (CHAPPUIS et al., 2007). As manifestações hematológicas também são comuns, principalmente, a anemia e a neutropenia. A anemia está associada a um estado inflamatório persistente, aumento da destruição periférica dos eritrócitos no baço e, às vezes, sangramento. A neutropenia (neutrófilos $500/mm^3$) aumenta o risco dos pacientes em apresentar uma infecção estabelecida ou oculta (BELIC et al., 2000; ABDELMOULA et al., 2003). As complicações infecciosas e as hemorragias são os principais fatores de risco para a morte na LV. A identificação precoce da doença é fundamental para se reduzir a letalidade por meio de tratamentos adequados (ANDRADE et al., 1990).

Aproximadamente 90% de todos os casos de LV ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (GUERIN et al., 2002). O Brasil tem a LV distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras. Em 2010, a região Nordeste representou 47,1% dos casos, seguida pelas regiões Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul. Os casos registrados são mais frequentes no sexo masculino (62,2%) e em crianças menores de 10 anos (46,2%) (MINISTÉRIODASAÚDE, 2011).

No Brasil, o agente etiológico da LV é a *Leishmania chagasi*. O genoma das espécies *L. infantum* e *L. chagasi* é idêntico, sendo então essa nomenclatura utilizada

como sinonímia (WHO, 2010). Nessa dissertação utilizaremos o termo *Leishmania chagasi* para distinguir a espécie aqui trabalhada daquela que ocorre na Europa.

Ciclo biológico da *Leishmania sp*

A *Leishmania* é um parasita digenético encontrado na forma promastigota (flagelada) no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (vetores flebotomíneos) e na forma amastigota nos hospedeiros vertebrados (WHO, 2008). A transmissão natural da *Leishmania* ocorre pela picada das fêmeas infectadas durante a alimentação no repasto sanguíneo, quando esses vetores injetam a saliva juntamente com os parasitas na forma promastigota no hospedeiro vertebrado. Essas formas flageladas invadem macrófagos do hospedeiro e transformam-se em formas amastigotas que se replicam no interior desta célula (Figura 1) (CHAPPUIS et al., 2007).

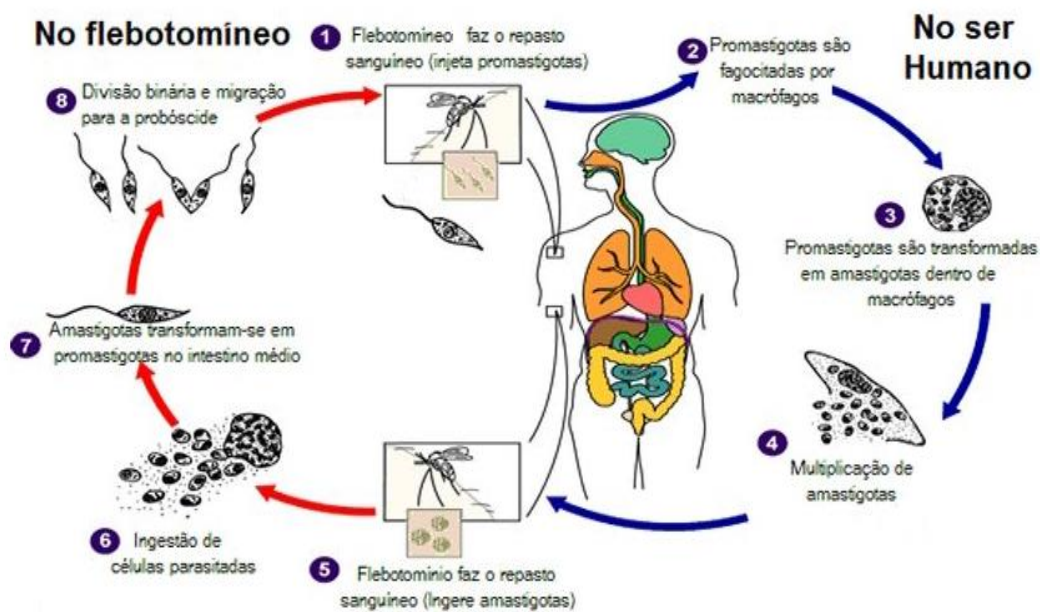


Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania sp.* Fonte: Adaptado de dpd.cdc.gov.

A *Leishmania*, apesar de ter como célula preferencial o macrófago, também é capaz de infectar outros tipos celulares como fibroblastos, células dendríticas e neutrófilos (BOGDAN et al., 2000). Vários grupos têm apontado um papel crucial dos neutrófilos nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania*. Um estudo conduzido

pelo grupo do David Sacks mostrou por microscopia intravital um intenso recrutamento de neutrófilos para o local da picada de flebotomíneos infectados (PETERS et al., 2008).

Neutrófilos: Características gerais

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) ou neutrófilos são as células mais abundantes no sistema imune inato, sendo as primeiras células recrutadas para o sítio de infecção (FOX et al., 2010). Neutrófilos são caracterizados pela presença de grânulos citoplasmáticos, um núcleo multilobado e marcadores de superfície específicos (KENNEDY & DELEO, 2009). Eles são gerados em grande número na medula óssea e circulam no sangue durante algumas horas se não forem recrutados para um sítio de inflamação (BORREGAARD, 2010).

O tempo de meia-vida curta dos neutrófilos é entre 8-20h e são constitutivamente programados para uma morte celular por apoptose, sendo posteriormente fagocitados por macrófagos. Esse é um mecanismo fundamental para manter a homeostase do sistema imunológico (EL KEBIR & FILEP, 2010).

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa contra infecções e sua capacidade de fagocitar e eliminar o patógeno são essenciais para a defesa do organismo (PHAM, 2008). A atividade microbicida dos neutrófilos envolve migração para o sítio de infecção, reconhecimento do patógeno e fagocitose com eliminação do microrganismo pela combinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e componentes citotóxicos dos grânulos (BORREGAARD, 2010).

Para chegar ao sítio de infecção, os neutrófilos saem da circulação periférica atravessando a parede do endotélio em um processo conhecido como transmigração. Esse processo se inicia com a interação entre selectinas do endotélio e dos neutrófilos promovendo o rolamento, seguido de uma firme adesão dessas células ao endotélio (KENNEDY & DELEO, 2009). Essa adesão é mediada pela expressão de β -integrinas na superfície dos neutrófilos, como CD11b/CD18, que também participam da transmigração. Moléculas quimioatrativas, a exemplo da interleucina-8 (IL-8), facilitam o caminho a ser percorrido pelos neutrófilos durante esse processo (KOBAYASHI, 2008). Uma vez completada a passagem pela parede do endotélio, ao encontrarem com um patógeno os neutrófilos ativam seus diversos sistemas antimicrobianos, liberando o

conteúdo dos grânulos para o vacúolo fagocítico ou para o exterior da célula (BORREGAARD, 2010).

Os grânulos dos neutrófilos são reservas de proteínas e peptídeos com diversas funções e podem ser classificados de acordo com a sua formação na sequência de diferenciação granulocítica: grânulos primários (azurofílicos), grânulos secundários (específicos) e grânulos terciários (gelatinases) (PHAM, 2006).

Os grânulos primários (azurofílicos) são os primeiros a serem produzidos e são responsáveis pela maioria da atividade microbicida, contendo a mieloperoxidase (MPO), as α -defensinas e as serina proteases (FOX et al., 2010). A MPO tem como atividade catalisar uma reação com peróxido de hidrogênio e cloreto para formar o ácido hipocloroso, um potente agente microbicida (DALE et al., 2008). As serina proteases, como a catepsina-G e a elastase neutrofílica (NE), exibem atividade proteolítica contra uma variedade de componentes da matriz extracelular, além de induzir a ativação de diversos tipos celulares, a exemplo dos macrófagos e linfócitos (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). Os grânulos secundários (específicos) possuem lactoferrina (capaz de quelar o ferro e o cobre), lisozimas e proteínas presentes na membrana plasmática, incluindo o flavocitocromo b558 do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) (SEGAL, 2005). Já os grânulos terciários são os grânulos que contêm enzimas gelatinases, como a metaloproteinase-9 (MMP-9), que tem a função de degradar a matriz extracelular durante a transmigração dos neutrófilos (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Além das enzimas presentes nos grânulos, os neutrófilos podem controlar infecções patogênicas ativando sua resposta oxidativa. A fagocitose de microrganismos ativa a formação do complexo NADPH oxidase na membrana do fagolisossomo. Esse sistema gera a produção do ânion superóxido (O_2^-), bem como outras ROS, os quais são conhecidos como importantes agentes microbicidas (FOX et al., 2010).

Foi descrito também outro mecanismo de morte de patógenos em neutrófilos, denominado de “*Neutrophils Extracellular Traps – NET*” (BRINKMANN et al., 2004). Os neutrófilos estimulados liberam histonas de DNA, proteínas e enzimas dos grânulos que juntos formam uma rede de fibras extracelular capaz de imobilizar e matar patógenos (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). As “NETs” foram encontradas *in vivo* em infecções como apendicite em seres humanos e *Shigella* em coelhos (BRINKMANN et al., 2004). Também já foi demonstrado a presença das NETs durante

a infecção por *Leishmania* (GUIMARAES-COSTA et al., 2009; GABRIEL et al., 2010).

Neutrófilos e infecção por Leishmania sp

Os neutrófilos desempenham um papel ativo no controle da infecção pela *Leishmania*, fagocitando esses parasitas, produzindo citocinas e mediadores inflamatórios ou interagindo com macrófagos promovendo infecção (APPELBERG, 2007; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

Os neutrófilos migram rapidamente para o local de inoculação da *Leishmania*, onde fagocitam esses parasitas e alguns conseguem sobreviver nessas células. Sendo assim, neutrófilos podem proporcionar um abrigo temporário para a *Leishmania* antes da sua entrada em macrófagos, onde os parasitas serão replicados (CHARMOY et al., 2010). Laskay e colaboradores propuseram a hipótese do “Cavalo de Tróia”, onde neutrófilos apoptóticos infectados por parasitas de *Leishmania major* seriam silenciosamente fagocitados por macrófagos (LASKAY et al., 2003). Em recente estudo do nosso grupo, foi observado que a saliva do inseto vetor da *L. chagasi* promove apoptose de neutrófilos possibilitando um ambiente anti-inflamatório favorável ao crescimento do parasita associado a indução de PGE₂ e inibição de ROS (PRATES et al., 2011).

Além de serem recrutados para o sítio de infecção, os neutrófilos têm um efeito direto na morte do parasita e na resposta imune protetora. Trabalhos *in vivo* mostraram que a depleção de neutrófilos durante a infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, como por *L. major* (LIMA et al., 1998), *L. donovani* (MCFARLANE et al., 2008) e *Leishmania braziliensis* (NOVAIS et al., 2009), resultou em aumento da carga parasitária. Ainda foi visto que os neutrófilos são capazes de fagocitar e destruir promastigotas de *L. infantum*, contribuindo para o controle inicial do crescimento parasitário em camundongos BALB/c (ROUSSEAU et al., 2001).

Na infecção inicial por *Leishmania amazonensis*, neutrófilos podem colaborar com o controle da carga parasitária através da liberação das NETs, devido ao seu efeito tóxico para o parasita (GUIMARAES-COSTA et al., 2009). Foi descrito para a infecção por *L. donovani*, que apesar das NETs não terem atividade microbicida sobre essa espécie, provavelmente ajudam na contenção de formas promastigotas no local da inoculação, facilitando a fagocitose por macrófagos (GABRIEL et al., 2010).

Os neutrófilos também se mostram importantes em fases mais tardias da doença, encontrados em lesões de pacientes com Leishmaniose Cutânea, eliminando formas amastigotas por meio da fagocitose (DABOUL, 2010). Em estudos realizados com neutrófilos humanos, Laufs e colaboradores demonstraram que a fagocitose de *L. major* por neutrófilos após opsonização resultou em morte do parasita via ativação dessas células (LAUFS et al., 2002). Além disso, neutrófilos humanos também foram capazes de matar a *L. donovani* através de mecanismos oxidativos (PEARSON & STEIGBIGEL, 1981).

Em se tratando de infecções por *L. donovani* ou *L. infantum (chagasi)* nos estudos de LV, a ativação de neutrófilos pode ser deflagrada pelos distúrbios hemolíticos, característicos da doença, possivelmente pela presença do heme livre. Diversos estudos observaram que o heme altera o status de ativação de neutrófilos, no entanto, o efeito desta relação na infecção por *Leishmania* ainda não foi explorado.

O grupamento heme

O heme é uma molécula composta por um átomo de ferro central ligado a quatro grupos porfirínicos (ferro protoporfirina IX), essencial para organismos aeróbicos. A estrutura do heme possui 3 variações, *a*, *b*, *c*, que se diferenciam por pequenas modificações químicas, sendo o heme *b* a variante mais comum em mamíferos (Figura 2) (SEVERANCE & HAMZA, 2009).

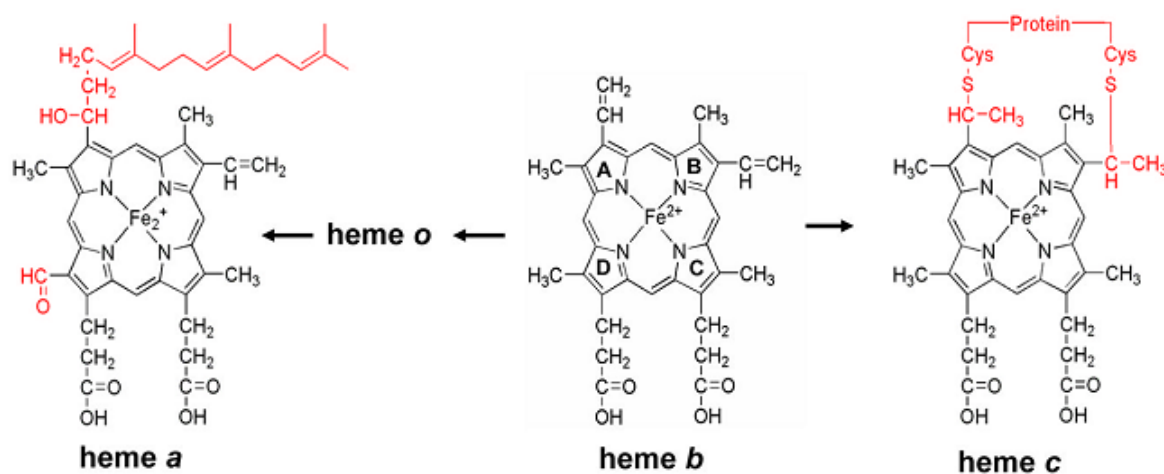


Figura 2. Estrutura química de formas variantes do heme. Fonte: SEVERANCE & HAMZA, 2009.

O heme é vital para diversos processos biológicos, funcionando como grupo prostético para proteínas envolvidas no transporte de oxigênio, respiração mitocondrial, metabolismo de drogas, biossíntese de esteroides, defesas celulares antioxidantes e processos de transdução de sinais (RYTER & TYRRELL, 2000). A função do grupo prostético heme é determinada pelas propriedades do polipeptídeo ao qual está ligado (PAOLI et al., 2002). Por exemplo, na hemoglobina e mioglobina, o heme é usado para o transporte e armazenamento de oxigênio, enquanto que no citocromo c é envolvido no transporte de elétrons, geração de energia e transformação química, já em catalases e peroxidases, a função do heme está associado a inativação ou ativação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente (WAGENER et al., 2003b).

O requerimento de heme varia significativamente em diferentes células e tecidos. A taxa mais rápida da síntese do heme ocorre nos eritrócitos da medula óssea (75% do total de heme do corpo) e nos hepatócitos do fígado (AJIOKA et al., 2006). A síntese do heme ocorre a partir de 8 reações enzimáticas na mitocôndria e parcialmente no citoplasma, iniciadas a partir de glicina e succinil-CoA (Figura 3). O heme recém-sintetizado é então incorporado em heme-proteínas ou degradado (LARSEN et al., 2012).

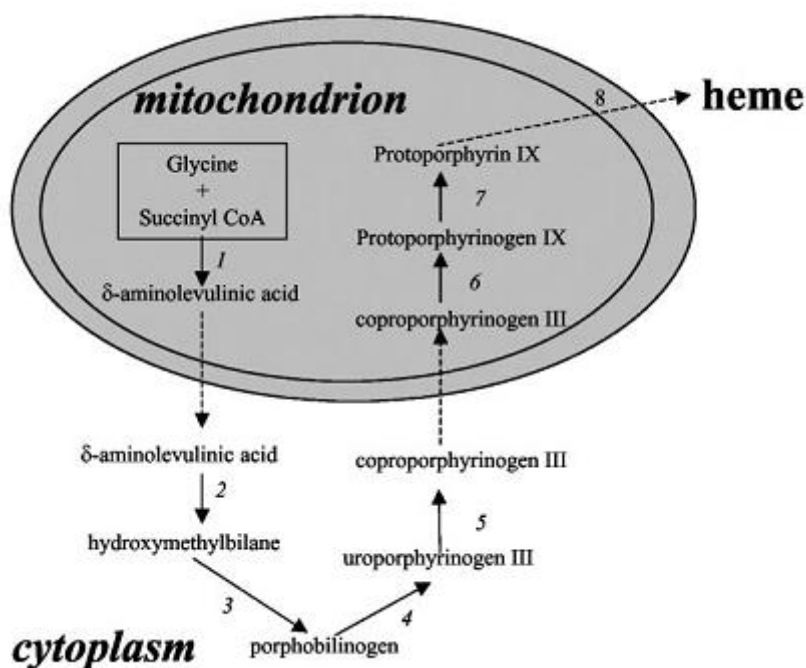


Figura 3. Síntese do heme. Fonte: Adaptado de WAGENER *et al.*, 2003b.

Em contraste aos seus efeitos benéficos, em condições patológicas, o heme pode ser liberado em quantidades excessivas pelas heme-proteínas (PAE & CHUNG, 2009). O heme livre, sendo bastante hidrofóbico, se intercala rapidamente nas membranas celulares e aumenta a susceptibilidade celular para morte oxidativa e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ele também pode catalisar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, gerando produtos tóxicos ao endotélio (BELCHER et al., 2010).

O átomo de Fe^{+2} no centro do anel porfirínico IX pode atuar como um reator de Fenton para produzir radicais hidroxilas, altamente tóxicos, derivados do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que causam danos a lipídios, proteínas e ao DNA (GOZZELINO et al., 2010).

O heme livre também é capaz de induzir ativação e migração leucocitária, através da modulação de moléculas de adesão e indução de citocinas (WAGENER et al., 2003a). Foi demonstrado que o heme induz a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos (SOARES et al., 2009) e estimula a migração e produção de ROS em neutrófilos, desempenhando um papel importante no desenvolvimento da inflamação (GRACA-SOUZA et al., 2002).

A inflamação induzida pelo heme está envolvida na patogênese de diversas doenças, como aterosclerose, vasculites, falha renal, reumatismo, rejeição de transplante e doenças autoimunes (WAGENER et al., 2003b). No contexto de infecções por microrganismos, um estudo indica o envolvimento do heme na patogênese da malária cerebral afetando a integridade da barreira hemato-encefálica, causando neuroinflamação (PAMPLONA et al., 2007). Os pacientes com malária grave apresentam maiores níveis de heme e a inflamação, possivelmente, é decorrente de uma relação positiva entre SOD-1 e TNF- α e redução dos níveis de PGE₂ e TGF- β no plasma (ANDRADE et al., 2010).

Entretanto, existem mecanismos citoprotetores para prevenir ou minimizar os efeitos deletérios do heme. A enzima heme oxigenase (HO) é o único meio pelo qual uma célula pode catabolizar heme (OTTERBEIN et al., 2003). A HO cliva o anel de protoporfirina IX do heme, produzindo biliverdina, monóxido de carbono e ferro. A biliverdina é convertida em bilirrubina pela ação da biliverdina redutase e o ferro livre é sequestrado pela ferritina. Ainda há proteínas extracelulares, como a haptoglobina, albumina, α -microglobulina e a hemopexina, que contribuem para o metabolismo do heme, retirando-o da circulação para ser degradado via HO-1 e HO-2 (LARSEN et al.,

2012). A haptoglobina forma complexos solúveis com os dímeros de hemoglobina, que se ligam ao receptor CD163 na superfície de macrófagos sendo endocitados (WAGENER et al., 2003b). Já a hemopexina liga-se ao heme livre com alta afinidade e esses complexos são internalizados pelo receptor CD91 principalmente em hepatócitos (GOZZELINO et al., 2010).

A forma induzível, HO-1, tem desempenhado um papel relevante nas infecções parasitárias. Na infecção por *Plasmodium* a expressão da HO-1 suprime os efeitos pró-oxidativos do heme livre limitando a gravidade da malária (SEIXAS et al., 2009). Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos C57BL/6 a indução de HO-1 reduz a carga parasitária no sangue e nos tecidos desses animais, sendo obtido resultado similar para a indução de HO-1 *in vitro* em macrófagos infectados com *T. cruzi* (PAIVA et al., 2012).

Relacionando a indução de HO-1 à infecção por *Leishmania*, Pham e colaboradores em 2005 observaram que amastigotas de *Leishmania pifanoi* inviabilizam a formação do complexo NADPH (uma enzima que contém grupamento heme) no vacúolo parasitóforo via ativação da enzima HO-1, o que resulta na degradação do heme. Isso impede a formação do polipeptídeo intermediário que compõe a enzima NADPH oxidase, como uma estratégia para evitar a produção de ROS (PHAM et al., 2005). Em dados recentes publicados pelo nosso grupo, foi visto que a indução da enzima HO-1 favorece a replicação e a infecção por *L. chagasi* em macrófagos humanos e murinos, com a redução de importantes mecanismos leishmanicidas nessas células. Vimos também que no soro de pacientes com LV há maiores níveis de HO-1 (LUZ et al., 2012) e de heme total (dados não publicados) quando comparados ao soro de indivíduos assintomáticos.

Pouco se conhece sobre o efeito do heme e da sua degradação pela enzima HO-1 nas infecções por parasitas do gênero *Leishmania*, principalmente envolvendo outros tipos celulares que são importantes durante o curso da doença, como os neutrófilos.

Relação entre heme e neutrófilos

Uma característica do processo inflamatório é o recrutamento de leucócitos dos vasos para os tecidos, onde o heme parece ter envolvimento induzindo a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais; aumentando a permeabilidade celular;

umentando a expressão de quimiocinas e induzindo a migração de leucócitos, especialmente os neutrófilos (WAGENER et al., 2003a).

O heme é uma molécula pró-inflamatória, capaz de induzir a migração de neutrófilos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (GRACA-SOUZA et al., 2002). Dados da literatura mostraram que esta migração é dependente da produção de leucotrieno B₄ (LTB₄), quimioatrativo de leucócitos, por macrófagos (MONTEIRO et al., 2011). Entretanto, o tratamento com os metabólitos da enzima HO reduz o recrutamento de neutrófilos para o endotélio, devido à diminuição de moléculas de adesão intercelular do tipo I (ICAM)-1 e β2-integrina, importantes durante esse processo (FREITAS et al., 2006; DAL-SECCO et al., 2010).

A interação do heme com neutrófilos humanos além da migração, ativa a produção de ROS e foi proposto que ambas atividades são mediadas por um receptor acoplado a proteína Gα_i (PORTO et al., 2007).

A apoptose de neutrófilos e subsequente remoção por fagócitos são fundamentais para a resolução da inflamação (SAVILL, 1997). Em estudos realizados com neutrófilos humanos, Arruda e colaboradores demonstraram que o heme retarda a apoptose dessas células *in vitro*. Um dos mecanismos consiste em degradar proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, induzindo a síntese de proteínas anti-apoptóticas, reforçando a sinalização para manter a integridade mitocondrial (ARRUDA et al., 2006). Desse modo, o aumento da sobrevivência de neutrófilos favorece a persistência da inflamação.

A inflamação induzida pelo heme é observada em doenças com hemólise aumentada ou dano celular extensivo. A acumulação de grandes quantidades de heme-proteínas ou heme livre, como em um coágulo de sangue ou após a deposição vascular, exaure a capacidade dos mecanismos de defesa contra o heme livre (FIGUEIREDO et al., 2007).

O heme livre pode atuar como catalisador pró-oxidante através da química de Fenton, o que poderia exacerbar uma lesão tecidual oxidativa por neutrófilos (SOARES et al., 2009). A indução farmacológica da enzima que degrada o heme, HO-1, modula a ativação de subunidades que compõem a enzima NADPH oxidase, diminuindo a produção de ROS por neutrófilos, limitando a lesão tecidual no intestino (LI et al., 2008). Esse achado corrobora com os dados de que esta enzima exibe propriedades opostas ao do heme, como anti-inflamatória e antioxidante (EXNER et al., 2004).

Em um modelo de fibrose cística pulmonar, a elastase neutrofílica foi à protease responsável pela degradação da hemoglobina, liberando heme. Um dos efeitos do heme foi a produção de IL-8, reforçando desta maneira o papel de neutrófilos na inflamação do pulmão (COSGROVE et al., 2011).

Neutrófilos do sangue de pacientes com doença falciforme apresentam maior expressão da $\beta 2$ -integrina, o que propicia aos neutrófilos uma aderência com maior avidéz ao endotélio inflamado e facilita a vaso oclusão pelo recrutamento de hemácias falciformes (LUM et al., 2004). Nesses pacientes, o heme é oriundo da destruição excessiva de hemácias e hemorragia e pode contribuir para deflagrar mecanismos de ativação de neutrófilos, como a indução de moléculas de adesão para migração leucocitária.

Em relação às infecções bacterianas, a redução de neutrófilos no sítio da infecção é associada à alta mortalidade na sepse grave. Em um modelo clássico de sepse que consiste na perfuração e ligação do ceco (CLP) foi visto que o pré-tratamento com o inibidor da HO-1 favorece a ativação e migração de neutrófilos, aumentando a sobrevivência dos camundongos (FREITAS et al., 2011). Entretanto, no pós-tratamento da sepse por CLP há evidências que a enzima HO-1 apresenta um efeito protetor por prevenir o dano tecidual provocado pelo heme liberado da hemoglobina durante a infecção (LARSEN et al., 2010; FREITAS et al., 2011).

No que se refere a patologias parasitárias, poucos estudos exploram a interação do heme e neutrófilos. Recentemente, foi demonstrado para malária grave que os neutrófilos são as células que mais expressam HO-1 no sangue periférico e a indução do gene *HMOX1* pela presença do heme, induz a explosão respiratória nessas células (WALTHER et al., 2012). Outro trabalho com malária mostrou que durante a infecção de camundongos BALB/c com *Plasmodium yoelii*, o aumento da infiltração de neutrófilos no fígado é correlacionada positivamente com o aumento da hemólise e contribui para o agravamento do dano hepático com a geração de ROS (DEY et al., 2012).

JUSTIFICATIVA

A LV é uma doença que consiste em uma parasitemia sistêmica visceralizante associada a distúrbios hemolíticos (CHAPPUIS et al., 2007). A pancitopenia é bem característica, agravada principalmente pela anemia e redução significativa de neutrófilos (neutrófilos < 500mm³) (BELIC et al., 2000). A anemia está relacionada à degradação da hemoglobina e consequente liberação de heme. Dados do nosso grupo mostram que no soro de pacientes com LV há maiores níveis de HO-1 (LUZ et al., 2012) e de heme (dados não publicados) do que no soro de indivíduos assintomáticos. Em relação aos neutrófilos, além de serem importantes em tempos iniciais da doença (PRATES et al., 2011), a neutropenia em pacientes graves favorece o estabelecimento de co-infecções (ANDRADE et al., 1990).

Sendo assim, a LV parece se encaixar em doenças com alterações hematológicas em que a relação heme e neutrófilos contribui para manutenção da inflamação (JENEY et al., 2002; LARSEN et al., 2012). Entretanto, essa perspectiva da doença ainda não foi explorada. A partir disso, torna-se relevante entender o envolvimento entre heme e neutrófilos humanos durante a infecção por *L. chagasi* no contexto do processo inflamatório da LV.

HIPÓTESE

O heme induz ativação de neutrófilos humanos favorecendo o processo inflamatório na infecção por *Leishmania chagasi*.

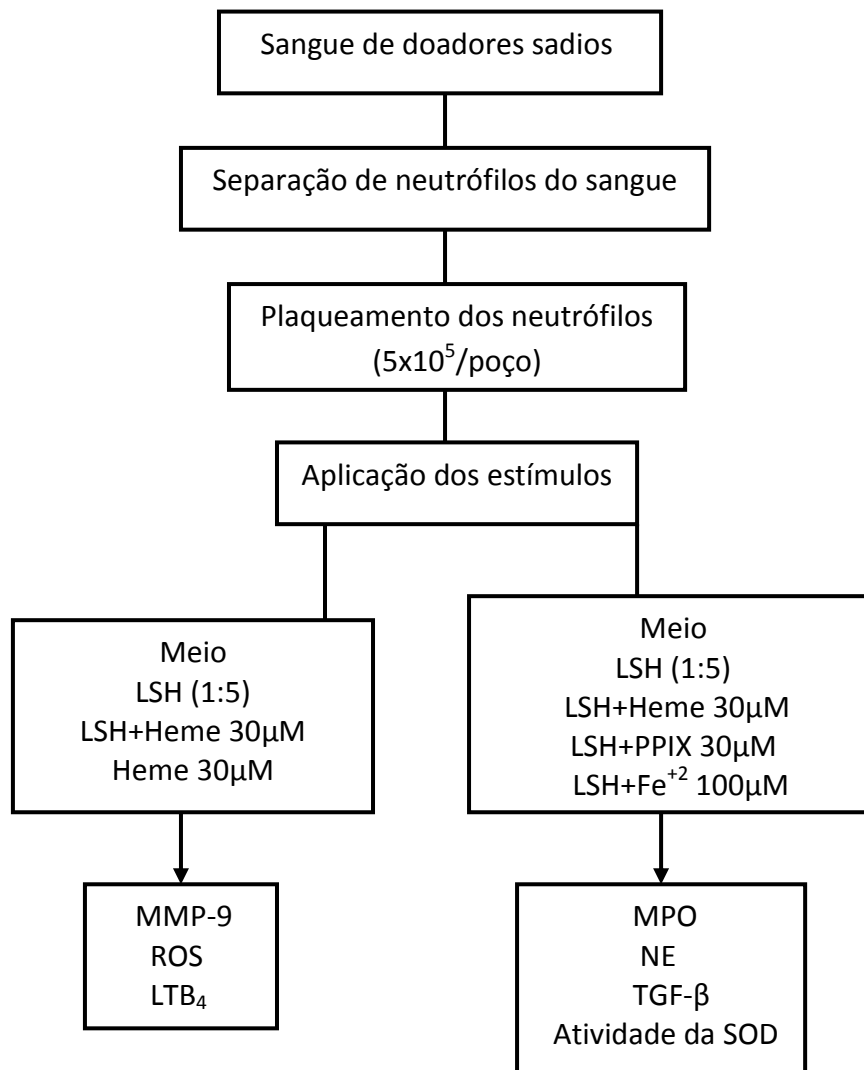
OBJETIVOS

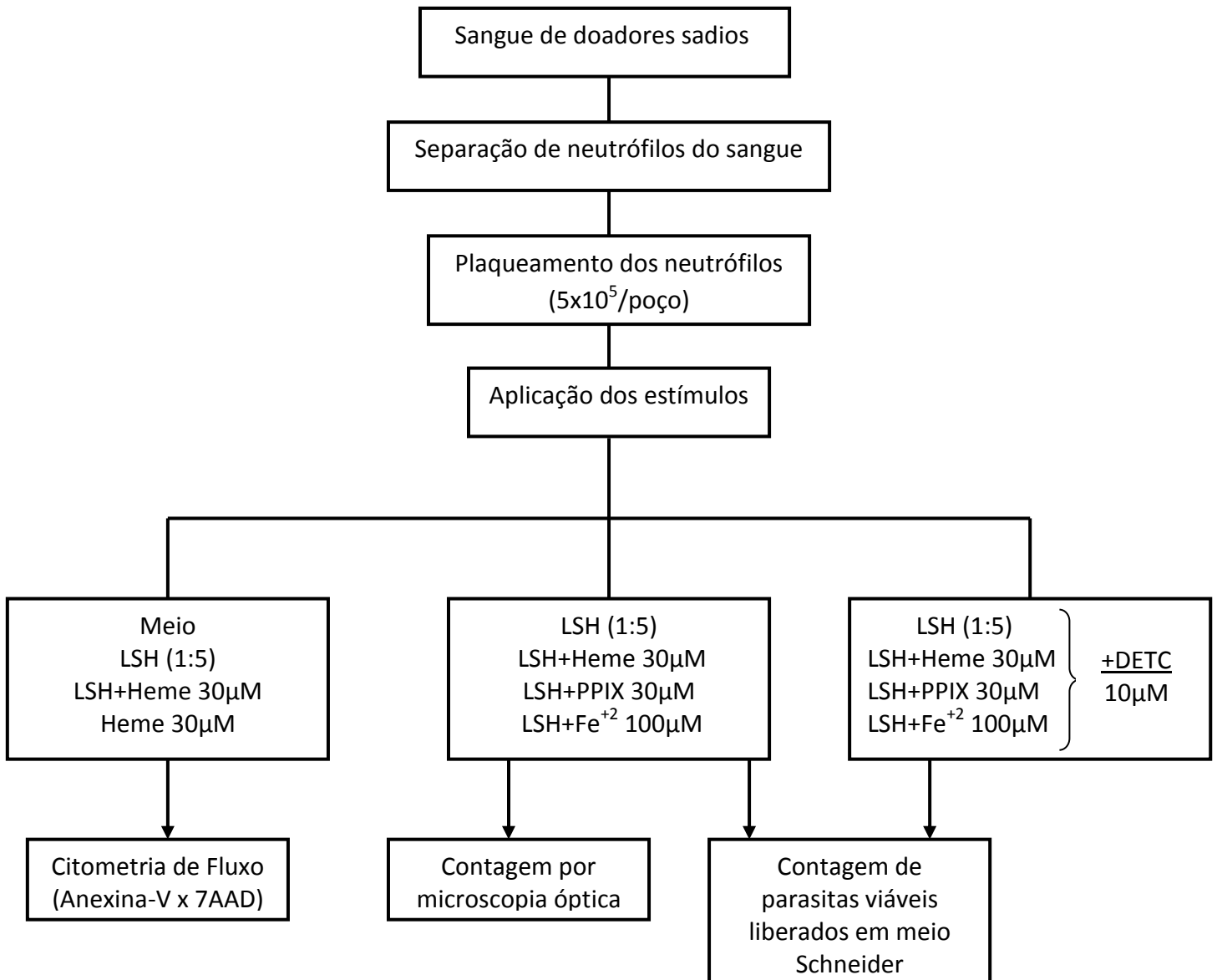
Objetivo Geral

Investigar o papel do heme sobre neutrófilos humanos durante a infecção por *L. chagasi*.

Objetivos Específicos

1. Analisar o efeito do heme na atividade inflamatória de neutrófilos infectados por *L. chagasi*;
2. Analisar o envolvimento do heme na apoptose de neutrófilos durante a infecção por *L. chagasi*;
3. Avaliar o papel do heme na carga parasitária de neutrófilos infectados por *L. chagasi*;
4. Comparar o efeito do heme ao da protoporfirina IX (PPIX) e do Fe^{+2} durante a infecção de neutrófilos por *L. chagasi*;
5. Avaliar o papel do heme em resposta a produção de moléculas anti-inflamatórias e antioxidantes durante a infecção de neutrófilos por *L. chagasi*.

DESENHO EXPERIMENTAL**AVALIAÇÃO DOS MEDIADORES**

AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E DA CARGA PARASITÁRIA

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de neutrófilos humanos: Sangue humano foi obtido de voluntários do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). Neutrófilos humanos foram isolados segundo protocolo adaptado de Afonso e colaboradores (AFONSO et al., 2008). Brevemente, o sangue coletado passou por um gradiente com o meio de separação de polimorfonucleares (PMN) conforme instruções do fabricante (Axis-ShieldPoc AS, Oslo, Norway). O sangue foi centrifugado por 30 minutos a 1300 RPM em temperatura ambiente. Após a centrifugação, duas bandas foram detectáveis: a primeira constituída de células mononucleares e a segunda banda enriquecida por PMN, caracteristicamente neutrófilos (aproximadamente 94% de pureza). Em seguida, os neutrófilos foram coletados e lavados três vezes com salina a 4°C por 10 minutos a 1300 RPM. Os neutrófilos então foram plaqueados na quantidade de 5×10^5 por poço, em placas de 96 poços, com meio RPMI 1640 (Gibco, Carsbad, CA, USA) suplementado com 1% de Nutridoma-SP e 1% de L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml).

Cultura de *Leishmania chagasi*: Promastigotas de *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/89/BA262) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de L-glutamina (2 Mm), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), à 23°C (estufa BOD). Em todos os experimentos as culturas de *L. chagasi* foram utilizadas apenas em fase estacionária.

Padronização da infecção: Foi realizado ensaio de padronização da infecção, onde neutrófilos humanos foram plaqueados na quantidade 5×10^5 por poço, com promastigotas estacionárias de *L. chagasi* na proporção (neutrófilo: parasita): 1:2, 1:5 e 1:10. Posteriormente às 3h de infecção, foi realizada a troca do meio por Schneider e depois de 1, 3 e 5 dias contamos as formas promastigotas viáveis que foram liberadas. Após analisar o resultado, optamos pela taxa de infecção 1:5 como sendo a mais apropriada para o estudo por ter apresentado contagens mais homogêneas.

Padronização da dose-resposta do heme na infecção de neutrófilos humanos por *L. chagasi*: Para estabelecer a concentração ideal do heme a ser utilizada nesse estudo, realizamos uma curva dose-resposta nas concentrações de 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M em culturas de neutrófilos infectados com *L. chagasi*. Após 3h de infecção, foi realizada a troca do meio por Schneider e depois de 1, 3 e 5 dias contamos as formas promastigotas viáveis que foram liberadas. A contagem demonstrou que no 1º dia tivemos diferenças entre as concentrações, mas essas diferenças foram perdidas nos dias seguintes, possivelmente, pela morte da célula e/ou proliferação excessiva do parasita. A partir dessa padronização, a concentração do heme que apresentou um efeito mais evidente foi a de 30 μ M, passando esse valor a ser utilizado nos ensaios seguintes.

Reagentes: O heme e a protoporfirina IX (PPIX, molécula análoga ao heme) foram obtidos comercialmente da Frontier Scientific (Logan, UT, USA). As drogas foram diluídas imediatamente antes do uso em NaOH 0,1 N e meio RPMI 1640 (Gibco, Carsbad, CA, USA) e ajustadas para a concentração de 30 μ M. O ferro (II) sulfato hidratado (FeSO₄.7H₂O) foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich (New Road, Gillingham, Reino Unido). O FeSO₄.7H₂O foi diluído em água destilada e ajustado para a concentração de 100 μ M, esse composto em solução libera o íon Fe⁺².

Infecção de neutrófilos com *L. chagasi*: Os neutrófilos humanos foram plaqueados na quantidade de 5x10⁵ por poço, com promastigotas estacionárias de *L. chagasi* a uma taxa de infecção 1:5 (neutrófilo: parasita) em presença ou ausência de heme. As culturas foram incubadas durante 3h a 37°C, 5% CO₂, para posteriormente avaliarmos a infecção. Quando utilizamos a PPIX e o Fe⁺², a infecção foi realizada como descrito anteriormente.

Avaliação da carga parasitária: Posteriormente às 3h de infecção em presença ou ausência de heme, a carga intracelular de *L. chagasi* nos neutrófilos foi avaliada em lâminas preparadas através do citospin, seguidas de coloração por hematoxilina-eosina (HE). Utilizando o microscópio óptico, fizemos uma contagem à cega de 200 células para a quantificação do percentual de neutrófilos infectados, bem como a quantidade de amastigotas por neutrófilo. Os resultados foram mostrados como percentual de neutrófilos infectados e amastigotas por 100 neutrófilos. Além da quantificação por microscopia óptica, e para as culturas em presença da PPIX ou do Fe⁺², fizemos a

leitura dos parasitas viáveis utilizando o método do Schneider adaptado de Ribeiro-Gomes e colaboradores (RIBEIRO-GOMES et al., 2004). Resumidamente, após o período de incubação, os neutrófilos infectados foram centrifugados a 1300 RPM por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo promastigotas não internalizados foi descartado e substituído por 250 µl de meio Schneider suplementado com 20% de SBF e 1% de L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Em seguida, os neutrófilos infectados foram incubados na estufa BOD 23°C e após 24h de incubação, foi realizada a contagem das formas promastigotas liberadas no meio usando câmaras de Neubauer.

Detecção das enzimas neutrofílicas: Os sobrenadantes das culturas de neutrófilos infectados em presença ou ausência do heme por 3h, foram coletados e testados para a produção de metaloproteinase-9 (MMP-9) por ELISA convencional, de acordo com as instruções do fabricante (R&D systems, Minneapolis, USA).

A atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e elastase neutrofílica (NE) foi avaliada nas mesmas condições experimentais, utilizando protocolos adaptados. Resumidamente, a atividade da mieloperoxidase foi avaliada no sobrenadante, imediatamente após 3h de infecção dos neutrófilos em presença ou ausência do heme, da PPIX ou do Fe⁺². Foi plaqueado 50 µl do sobrenadante fresco dessas culturas em placas de 96 poços de ELISA, seguido da adição de 50 µl do tampão de revelação (tampão citrato 0,1 M, pH 5, dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL e peróxido de hidrogênio 30%) e incubados por aproximadamente 20 minutos, protegidos da luz. A atividade da mieloperoxidase foi mensurada pela leitura em espectrofotômetro na absorvância 492 nm, utilizando a densidade óptica. Para atividade enzimática da enzima elastase neutrofílica, foi utilizado 50 µl do sobrenadante fresco dessas culturas, e em seguida foi adicionado 25 µl do tampão de reação, pH 7,5 (0.1 M HEPES, 0.5 M NaCl, 10% dimetilsulfóxido (todos da Sigma-Aldrich, St Louis, MO)) acrescido de 150 µl do substrato I da elastase (MeOSuc-AAPV-pna) a 0.2 mM (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) e incubados a 37°C por 3 dias. A atividade da elastase foi mensurada pela leitura em espectrofotômetro na absorvância 410 nm, utilizando a densidade óptica.

Detecção de Leucotrieno-B₄ (LTB₄): Os sobrenadantes das culturas de neutrófilos infectados em presença ou ausência do heme por 3h, foram coletados e utilizados para a

detecção de LTB₄ por EIA, de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical Company, MI, USA).

Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS): Após 1h de interação entre os neutrófilos humanos e os estímulos *L. chagasi*, *L. chagasi* junto com heme e somente o heme, foi feita a incubação dessas células com a sonda fluorescente *Dihydroethidium* (DHE) (10μM – Invitrogen/Molecular Probes, Grand Island, NY, USA) por 30 minutos. Ao entrar nas células, a sonda DHE ao ser oxidada por ânions superóxidos emite fluorescência vermelha, sendo detectada por citometria de fluxo (FACSCalibur).

Avaliação da apoptose de neutrófilos: Após às 3h de infecção em presença ou ausência do heme, a apoptose nesses neutrófilos foi avaliada pela exposição de fosfatidilserina na superfície celular através da marcação com Anexina-V-PE em combinação com 7-amino-actinomicina D (7AAD) (kit de detecção de apoptose, BD Bioscience), seguida da análise por citometria de fluxo (FACSCalibur). Os resultados estão representados como percentual de células Anexina-V⁺/7AAD⁻, Anexina-V⁺/7AAD⁺ e Anexina-V⁻/7AAD⁺.

Dosagem do fator transformante de crescimento (TGF-β): Os sobrenadantes das culturas de neutrófilos infectados em presença ou ausência do heme, da PPIX ou do Fe⁺² por 3h, foram coletados e utilizados para a dosagem de TGF-β por ELISA convencional, de acordo com as instruções do fabricante (R&D systems, Minneapolis, USA).

Detecção da atividade da superóxido dismutase (SOD): Os sobrenadantes das culturas de neutrófilos infectados em presença ou ausência do heme, da PPIX ou do Fe⁺² por 3h, foram coletados e utilizados para detectar a atividade de SOD (os 3 principais tipos de SOD: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e FeSOD), de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical Company, MI, USA).

Uso do inibidor dietilditiocarbamato (DETC): Os neutrófilos humanos foram plaqueados na quantidade de 5x10⁵ por poço, com promastigotas estacionárias de *L. chagasi* a uma taxa de infecção 1:5 (neutrófilo: parasita) em presença do heme (30μM) ou do Fe⁺² (100μM). Ao mesmo tempo, adicionamos a essas culturas o DETC (10μM),

inibidor da atividade da SOD. Após 3h de incubação a 37°C, 5% CO₂, avaliamos proliferação do parasita pelo método do Schneider, já descrito anteriormente.

Análise estatística: As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). As comparações foram feitas utilizando-se o teste não paramétrico One-way ANOVA Kruskal-Wallis (para mais de duas amostras) com pós-teste de Dunn. O teste paramétrico *T student* e o não paramétrico Mann-Whitney, ambos para duas amostras, foram utilizados para comparar os grupos estimulados em relação ao controle. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Ativação de neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* em presença do heme

O papel do heme sobre a ativação de neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* em ausência ou presença do heme foi inicialmente analisado a partir da liberação de enzimas neutrofílicas no sobrenadante dessas culturas por ensaio colorimétrico. Após 3h, neutrófilos infectados na ausência de heme induziram apenas a liberação de MMP-9 (Fig. 4A), sem alterar a atividade das enzimas MPO e NE (Fig. 4B e 4C). Por outro lado, quando a infecção dos neutrófilos ocorreu em presença de heme os níveis de MMP-9 foram mantidos, enquanto houve um aumento na atividade de MPO (Fig. 4B) e da NE (Fig. 4C) em comparação aos neutrófilos infectados apenas com a *Leishmania*. Todas as enzimas neutrofílicas foram aumentadas durante a infecção em presença de heme em comparação ao grupo controle de neutrófilos não infectados (Fig. 4A-C).

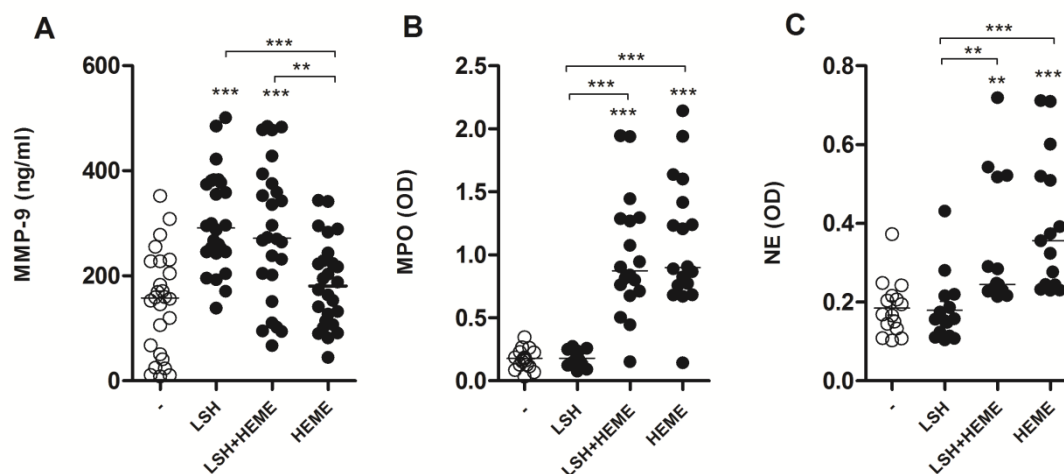


Figura 4. Efeito do heme sobre as enzimas neutrofílicas durante a infecção por *L. chagasi*. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* na ausência ou presença de heme (30 μ M). Após 3h de incubação, a quantificação de MMP-9 (A) e a atividade da MPO (B) e NE (C) no sobrenadante dessas culturas foram realizadas por ensaio colorimétrico. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,01$) (***, $p < 0,001$).

Produção de ROS durante a interação de neutrófilos infectados com *L. chagasi* e heme

Dados na literatura descrevem o forte potencial do heme em induzir a produção de ROS em diversos modelos, principalmente em neutrófilos humanos (PORTO et al., 2007). Para investigarmos a produção de ROS no nosso estudo, 1h após a infecção de neutrófilos por *L. chagasi* em presença ou ausência do heme, incubamos essas células com uma sonda que reage em contato com íons superóxidos. A análise por citometria de fluxo revelou um aumento significativo na geração de ROS devido ao tratamento com heme em comparação aos grupos que não foram tratados (Fig. 5). A produção de ROS não foi estatisticamente significativa quando comparamos somente a infecção por *L. chagasi* com o grupo controle.

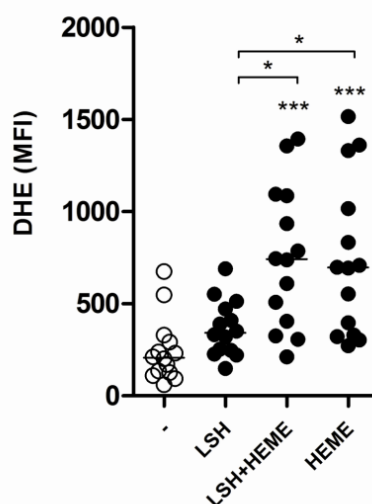


Figura 5. A presença do heme induz estresse oxidativo em neutrófilos infectados com *L. chagasi*. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* na ausência ou presença de heme (30 μ M). Após 1h, esses neutrófilos foram incubados com a sonda de *dihydroethidium* (DHE) e a produção de ROS foi analisada por citometria de fluxo. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (*, $p < 0,05$) (***, $p < 0,001$).

Detecção de LTB₄ em neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* em presença do heme

O LTB₄ é um potente mediador de ativação e de quimiotaxia para neutrófilos (KIM & HAYNES, 2012). De modo a contribuir com a caracterização do estado de ativação dos neutrófilos observado nos dados acima, sabendo que o heme induz a migração de neutrófilos mediada pela produção de LTB₄ (MONTEIRO et al., 2011), fomos observar como a presença do heme modula a liberação de LTB₄ durante a infecção de neutrófilos humanos por *L. chagasi*. A detecção do LTB₄ foi feita no sobrenadante, posteriormente às 3h de interação entre os estímulos. A análise por EIA demonstra que o heme aumenta a liberação de LTB₄, sem interferência da infecção, já que o parasita sozinho não mostra o mesmo efeito (Fig. 6).

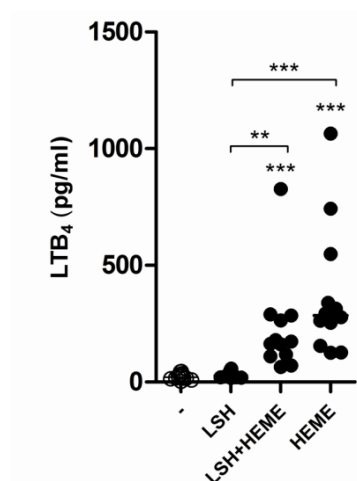


Figura 6. Neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* aumentam a liberação de LTB₄ em presença do heme. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* na ausência ou presença de heme (30µM). Após 3h de incubação, os níveis de LTB₄ no sobrenadante dessas culturas foram detectados por EIA. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p<0,01$) (***, $p<0,001$).

Efeito do heme na sobrevivência de neutrófilos humanos durante a infecção por *L. chagasi*

Já foi demonstrado que o heme em diferentes concentrações retarda a apoptose em neutrófilos humanos após 20h de incubação (ARRUDA et al., 2004), porém isso ainda não foi explorado no contexto de infecção por *Leishmania*. Seguindo às 3h de infecção dos neutrófilos humanos por *L. chagasi* em presença ou ausência do heme, incubamos as células com os marcadores Anexina-V-PE e 7AAD e analisamos a sobrevivência dessas células por citometria de fluxo. Em presença do heme a maior parte dos neutrófilos estão apoptóticos (Fig. 7A) e um menor percentual em processo de apoptose tardia/necrose secundária (Fig. 7B) em relação aos neutrófilos não tratados com heme. Não observamos alteração significativa no percentual de neutrófilos necróticos independente do tratamento (Fig. 7C). A infecção por *L. chagasi* na ausência de heme não apresentou nenhum efeito sobre a longevidade das células.

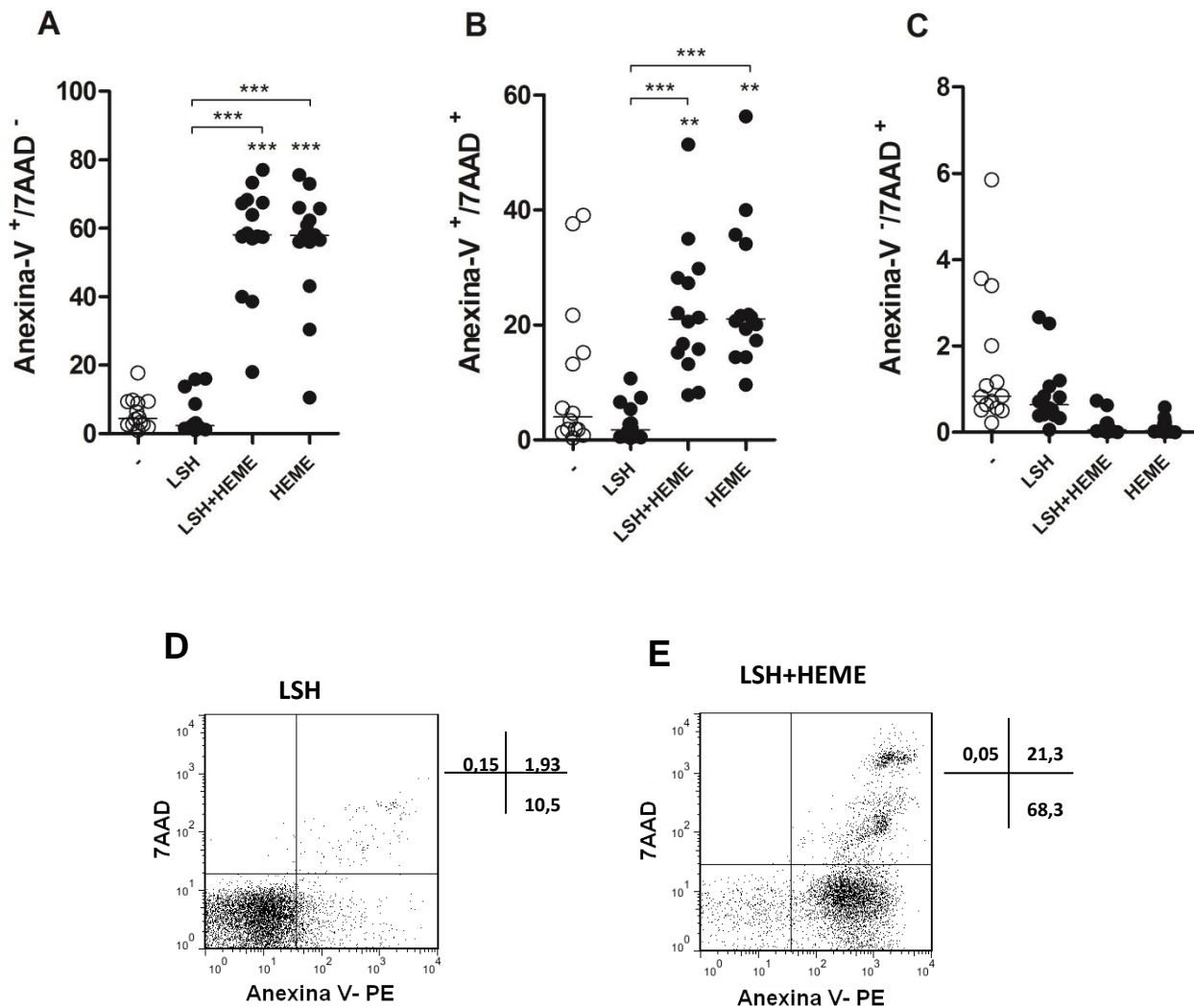


Figura 7. Heme induz morte celular em neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi*. Após 3h de incubação, em neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* em ausência ou presença de heme (30µM), a morte celular foi avaliada pela marcação de Anexina V e 7AAD por citometria de fluxo. Os resultados estão representados como percentual de células em (A) Apoptose: Anexina-V⁺/7AAD⁻; (B) Apoptose tardia/necrose secundária: Anexina-V⁺/7AAD⁺ e (C) Necrose: Anexina-V⁻/7AAD⁺. Representação percentual por dot-plot é mostrada para os grupos LSH (D) e LSH+HEME (E). Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,01$) (***, $p < 0,001$).

Efeito do heme na carga parasitária de neutrófilos humanos por *L. chagasi*

Para avaliarmos como o heme poderia interferir na carga do parasita, infectamos os neutrófilos humanos com *L. chagasi* e incubamos essas células na ausência ou presença de heme por 3h. Posteriormente, a carga parasitária foi avaliada através da contagem por microscopia óptica. No que se refere ao percentual de neutrófilos infectados (Fig. 8A) e amastigotas por 100 neutrófilos (Fig. 8B), não foi evidenciada nenhuma diferença significativa entre os grupos após o tratamento com heme. Entretanto, na contagem das formas promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante de culturas de neutrófilos infectados por 3h, observamos que a presença do heme favorece uma proliferação significativa dos parasitas ao ser comparado com o grupo sem tratamento (Fig. 8C). Essas observações sugerem um possível mecanismo de escape da ativação neutrofílica, que permite a esses parasitas aumentarem sua replicação em presença do heme.

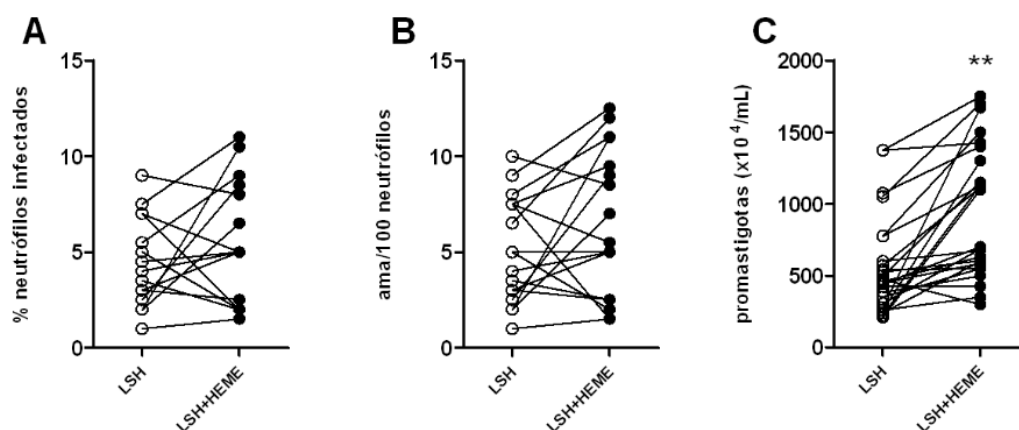


Figura 8. Heme não interfere na infecção por *L. chagasi*, mas favorece a viabilidade do parasita em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* (1:5) na ausência ou presença de heme (30 μ M) por 3h. Em seguida, os neutrófilos foram citocentrifugados e corados com HE para avaliação da carga parasitária por microscopia óptica. (A) Indica o percentual de neutrófilos infectados e (B) o número de amastigotas por 100 neutrófilos. Em (C), após 3h de infecção o meio RPMI foi substituído por meio Schneider (meio de cultura para *Leishmania*) e após 24h, os promastigotas viáveis liberados no sobrenadante dessas culturas foram contados. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste paramétrico T student (**, $p < 0,01$).

Papel das moléculas associadas ao heme na replicação de *L. chagasi* em neutrófilos humanos

Como vimos que o heme favorece a replicação da *L. chagasi*, fomos então investigar se moléculas presentes na composição do heme apresentariam um resposta similar. Utilizamos a PPIX, que é uma molécula análoga ao heme, sendo diferente por não apresentar o átomo central de ferro e o próprio ferro no estado reduzido (Fe^{+2}), obtido pela diluição do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Heme, PPIX ou Fe^{+2} foram adicionados à cultura de neutrófilos com *L. chagasi* durante 3h e então realizamos o método de contagem de promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante de culturas de neutrófilos infectados. A contagem mostrou que a presença tanto da PPIX quanto do Fe^{+2} favorecem a proliferação do parasita em relação ao grupo somente com *L. chagasi* (Fig. 9). Os grupos tratados com as moléculas não evidenciaram diferença na replicação parasitária ao serem comparados com o grupo tratado com heme.

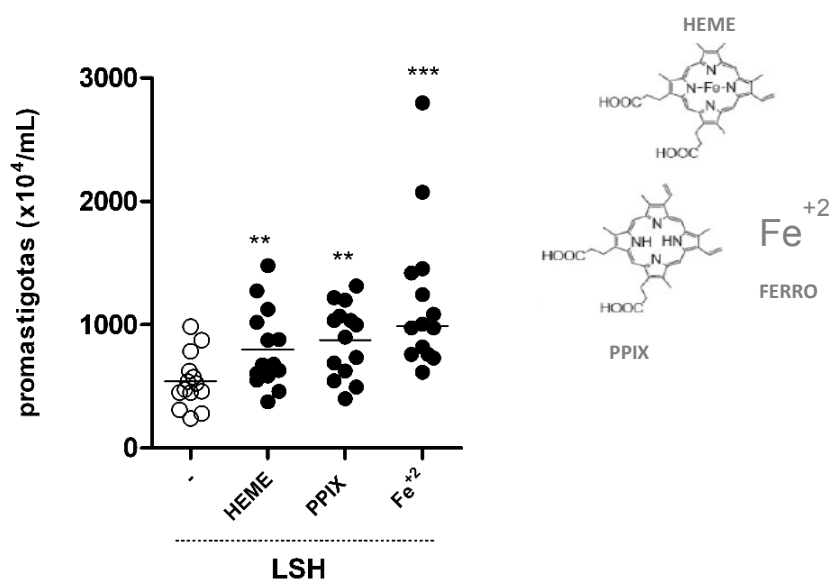


Figura 9. A PPIX e o Fe^{+2} também contribuem para proliferação da *L. chagasi* em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* (1:5) em presença do heme ($30\mu\text{M}$), da PPIX ($30\mu\text{M}$) ou do Fe^{+2} ($100\mu\text{M}$) por 3h. Posteriormente, o meio RPMI foi substituído por meio Schneider (meio de cultura para *Leishmania*) e após 24h, os promastigotas viáveis liberados no sobrenadante dessas culturas foram contados. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,01$) (***, $p < 0,001$).

Ativação das enzimas neutrofílicas pela presença de moléculas associadas ao heme durante a infecção por *L. chagasi*

A próxima etapa foi avaliar se a presença da PPIX ou do Fe^{+2} induziriam um resultado semelhante ao da presença do heme quanto a ativação de neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi*. Após as 3h de interação entre os estímulos, avaliamos atividade de MPO e NE através de ensaio colorimétrico. A atividade das enzimas MPO (Fig. 10A) e NE (Fig. 10B) não foram alteradas devido à presença da PPIX ou do Fe^{+2} em comparação aos neutrófilos infectados incubados com heme.

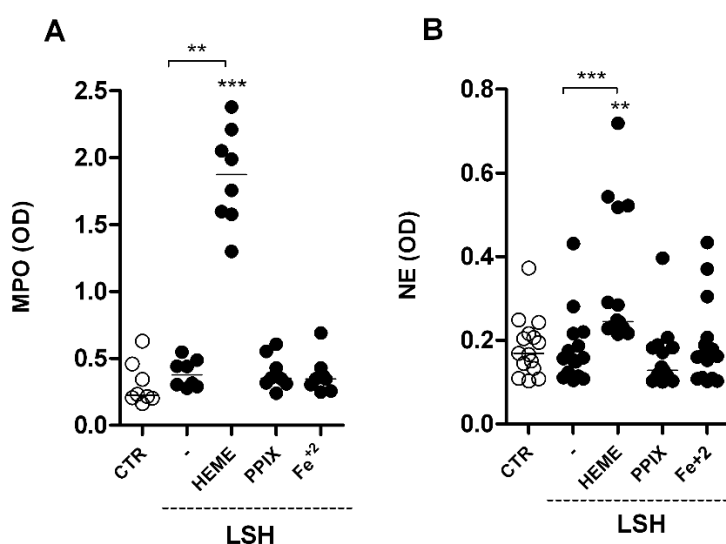


Figura 10. A presença da PPIX ou do Fe^{+2} não interfere na atividade da MPO ou da NE. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* em presença do heme ($30\mu\text{M}$), da PPIX ($30\mu\text{M}$) ou do Fe^{+2} ($100\mu\text{M}$). Após 3h de incubação, a atividade da MPO (A) e da NE (B) no sobrenadante dessas culturas foi realizada por ensaio colorimétrico. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,01$) (***, $p < 0,001$).

Indução da resposta anti-inflamatória via TGF- β nos neutrófilos infectados com *L. chagasi* em presença do heme

Uma vez que temos uma forte resposta inflamatória e ainda assim notamos um aumento da proliferação da *L. chagasi*, procuramos investigar quais mecanismos poderiam estar balanceando a ativação do neutrófilo de modo a favorecer o crescimento do parasita. Nesse contexto, avaliamos a participação do TGF- β , uma molécula conhecida por beneficiar a infecção por *Leishmania* (BARRAL-NETTO et al., 1992; AFONSO et al., 2008). Após 3h de infecção dos neutrófilos humanos por *L. chagasi* em presença do heme, da PPIX ou do Fe⁺² avaliamos os níveis de TGF- β no sobrenadante dessas culturas por ELISA. A presença do heme leva a níveis significantes de TGF- β quando comparado ao grupo apenas com *L. chagasi* e ao grupo sem estímulos (Fig. 11). A presença da PPIX ou do Fe⁺² não alterou os níveis de TGF- β .

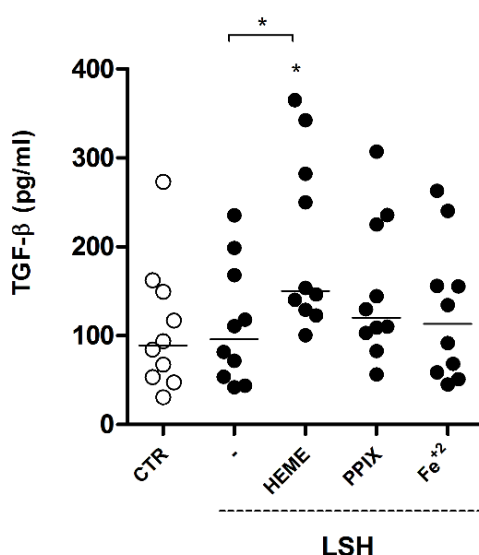


Figura 11. O heme induz produção do mediador anti-inflamatório TGF- β em neutrófilos infectados com *L. chagasi*. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* em presença do heme (30 μ M), da PPIX (30 μ M) ou do Fe⁺² (100 μ M) durante 3h. Os níveis de TGF- β no sobrenadante dessas culturas foram detectados por ELISA. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (*, $p < 0,05$).

Ativação de mecanismos anti-oxidativos em neutrófilos humanos durante a infecção por *L. chagasi* em presença do heme

Antioxidantes também representam mecanismos que podem beneficiar a sobrevivência do parasita. Já foi demonstrado que a presença da SOD tem um efeito protetor para *L. amazonensis*, uma vez que com inibição da enzima tem-se o controle da infecção em macrófagos humanos (KHOURI et al., 2009). Fomos então analisar se o heme interfere na atividade da SOD em neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi*. Após 3h de interação entre os estímulos, o ensaio colorimétrico revelou que tanto o heme quanto o Fe^{+2} aumentaram a atividade da SOD em relação ao grupo apenas com *L. chagasi* e ao grupo sem estímulos (Fig. 12). O tratamento com PPIX não alterou a atividade da SOD.

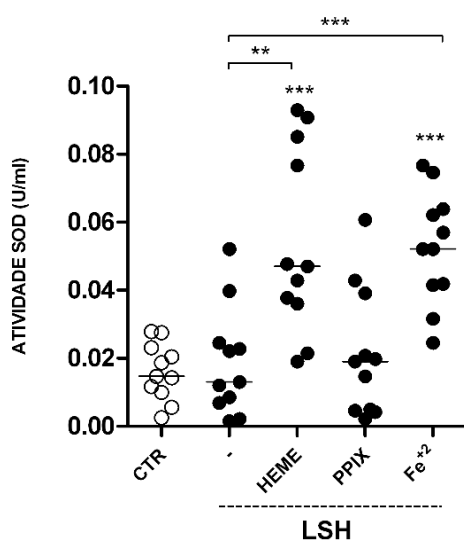


Figura 12. Neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* aumentam atividade da SOD em presença de heme ou de Fe^{+2} . Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* em presença do heme ($30\mu\text{M}$), da PPIX ($30\mu\text{M}$) ou do Fe^{+2} ($100\mu\text{M}$). Após 3h de incubação, a atividade de SOD no sobrenadante dessas culturas foi realizada por ensaio colorimétrico. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,01$) (***, $p < 0,001$).

A fim de confirmarmos a contribuição da SOD para a replicação do parasita, utilizamos o dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor da atividade da SOD, junto a infecção de neutrófilos humanos por *L. chagasi* em presença do heme ou do Fe^{+2} por 3h. A contagem de promastigotas no sobrenadante evidencia uma redução no número de parasitas em todos os grupos que foram tratados com DETC ao serem comparados aos grupos sem o inibidor (Fig. 13).

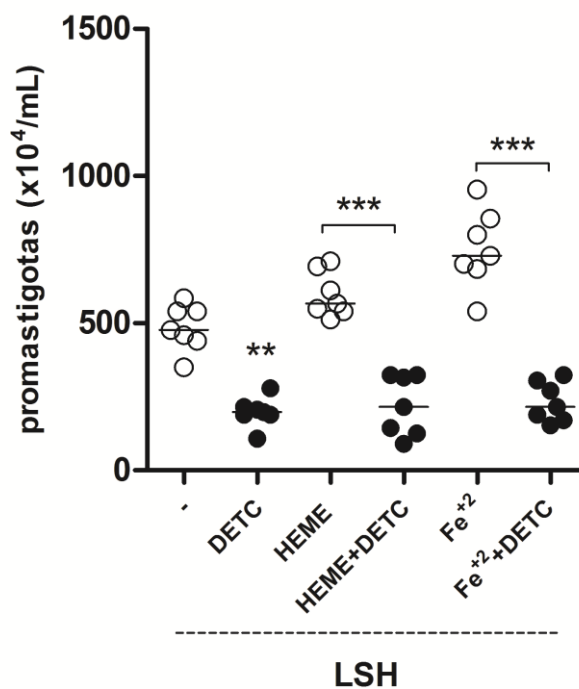


Figura 13. A inibição da SOD pelo DETC diminui a replicação da *L. chagasi* em neutrófilos humanos, mesmo em presença do heme. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. chagasi* (1:5) em presença do heme (30 μM) ou do Fe^{+2} (100 μM) e ao mesmo tempo foi adicionado a essas culturas o DETC (10 μM). Posteriormente às 3h de incubação, o meio RPMI foi substituído por meio Schneider (meio de cultura para *Leishmania*) e após 24h, os promastigotas viáveis liberados no sobrenadante dessas culturas foram contados. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (**, $p < 0,01$) (***, $p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Doenças caracterizadas por hemólise ou dano celular aumentado, associadas ou não a presença de um agente infeccioso, causam uma intensa resposta inflamatória. No caso da LV, pacientes em estado grave apresentam alterações hematológicas, como sangramento, neutropenia e baixa de plaquetas (SAMPAIO et al., 2010). Sob essas condições, o heme pode ser liberado a partir de heme-proteínas favorecendo a persistência da inflamação sistêmica característica da LV. Sabendo-se que o heme deflagra uma série de mecanismos inflamatórios associados à ativação de neutrófilos (GRACA-SOUZA et al., 2002), nós investigamos nesse estudo o efeito do heme sobre neutrófilos humanos durante a infecção por *L. chagasi*.

A capacidade do heme em alterar o status de ativação de neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* foi demonstrada, inicialmente, pela liberação de enzimas presentes nos grânulos neutrofílicos. Os níveis de MMP-9, MPO e NE foram aumentados significativamente durante a infecção em presença do heme. Entretanto, nos neutrófilos infectados na ausência do heme, a MMP-9 foi a única enzima a ser modulada pelo parasita, o qual aumentou a liberação da enzima em comparação aos neutrófilos do grupo controle. A MMP-9 está presente nos grânulos das gelatinases que são os primeiros a liberarem seu conteúdo em resposta a estímulos exógenos (BORREGAARD & COWLAND, 1997). É possível que o heme por induzir uma resposta muito intensa, tenha deflagrado uma rápida liberação de MMP-9 no sobrenadante de neutrófilos não infectados, que não pôde ser detectada no tempo de 3h. Pretendemos fazer estudos de cinética para avaliar o efeito do heme sobre a liberação de enzimas dos grânulos neutrofílicos em tempos mais iniciais.

A MPO é uma enzima que catalisa a formação do ácido hipocloroso, um importante composto microbicida (DALE et al., 2008). O ácido hipocloroso quando é produzido em quantidades excessivas, provoca danos teciduais, principalmente, durante distúrbios inflamatórios envolvendo liberação do heme. Nesse sentido, foi descrito que o ácido hipocloroso é capaz de degradar o heme sem atingir o átomo de ferro central, representando um potencial reforço à lesão oxidativa em condições patológicas (MAITRA et al., 2011; SOUZA et al., 2011). A NE demonstrou atividade semelhante. Em um modelo de fibrose cística pulmonar, a elastase neutrofílica foi a protease responsável por degradar a hemoglobina, liberando heme (COSGROVE et al., 2011). O

heme então reforça a inflamação no pulmão através da produção de IL-8, mediador quimiotático para neutrófilo (COSGROVE et al., 2011).

Diversos trabalhos trazem a produção de ROS como principal mecanismo desencadeado pelo heme durante a ativação de neutrófilos (GRACA-SOUZA et al., 2002; ARRUDA et al., 2006; PORTO et al., 2007). Assim como, esse também é um mecanismo microbicida induzido pela infecção por várias espécies de *Leishmania*, que ajuda a célula hospedeira no combate ao parasita (NADERER & MCCONVILLE, 2008; RITTER et al., 2009). Nós observamos que a infecção por *L. chagasi* levou a uma tendência de aumento na geração de ROS em comparação aos neutrófilos do grupo controle, e essa resposta foi exacerbada de modo significativo em presença do heme. O fato da *L. chagasi* sozinha não desencadear essa produção de ROS de modo significativo, assim como foi visto para as enzimas MPO e NE, sugere que esse possa ser um sistema de escape da *L. chagasi* que permite a esta espécie visceralizar na LV. Entretanto, como a produção de ROS foi analisada apenas no tempo de 1h, não podemos descartar que essa diferença seja detectada em tempos menores de interação. Estudos adicionais nesse contexto estão em andamento.

Presumivelmente, o efeito citotóxico do heme é mediado pela geração de ROS e estresse oxidativo (LARSEN et al., 2012). A concentração intracelular de heme pode exceder a taxa de catabolismo da HO-1, enzima responsável pela degradação do heme, ocasionando o acúmulo de produtos do seu metabolismo, como o ferro. O ferro é conhecido por favorecer a produção de ROS, levando a peroxidação e oxidação de biomoléculas (BELCHER et al., 2010). As publicações vinculam a produção de ROS principalmente ao neutrófilo, no qual o heme induz essa produção via NADPH oxidase, dependente da ativação de um receptor acoplado a proteína $G\alpha_i$ (PORTO et al., 2007).

De modo ainda a contribuir com a caracterização da ativação neutrofílica induzida durante a infecção em resposta ao heme, nós investigamos a produção de LTB_4 , importante fator leishmanicida descrito para macrófagos (SEREZANI et al., 2006). O LTB_4 age diretamente sobre a fisiologia de neutrófilos, como um agente pró-inflamatório, induzindo a expressão de moléculas de superfícies associadas ao processo de transmigração, estimulando a geração de ROS e atividade fagocítica (SUMIMOTO et al., 1984; NOHGAWA et al., 1997; MANCUSO et al., 2001). Além disso, foi visto *in vivo* que o tratamento de camundongos C57BL/6 com o heme aumentou os níveis de LTB_4 mediando o recrutamento de neutrófilos (MONTEIRO et al., 2011). Aqui, apenas neutrófilos infectados em presença de heme foram capazes de

induzir a produção de LTB₄. Interessante, que a infecção dessas células por *L. chagasi* não induziu a produção de LTB₄. Esse achado foi diferente de dados recentes do nosso grupo, onde a infecção de neutrófilos humanos por *L. amazonensis* levou ao aumento dos níveis de LTB₄ (TAVARES et al., manuscrito em preparação). Isso sugere mais uma vez, que diferentes espécies de *Leishmania* podem deflagrar respostas distintas na ativação de neutrófilos.

Apesar de já ter sido descrito que neutrófilos tratados com heme (1-50µM) durante 20h têm aumento da sobrevivência por inibição da apoptose (ARRUDA et al., 2004), nossos estudos apresentaram um resultado contrário. Enquanto esses autores demonstraram um retardo na apoptose de neutrófilos em presença de heme, dependente da produção de ROS, regulando o balanço entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (ARRUDA et al., 2006), nós observamos que a maior parte dos neutrófilos infectados em presença de heme (30µM) por 3h estavam apoptóticos e um percentual menor encontrava-se em apoptose tardia/necrose secundária.

Muitos sinais que conduzem a apoptose são conhecidos por induzir estresse oxidativo. Neutrófilos ativados produzem ROS, caracterizado como um potente mecanismo microbicida, mas o acúmulo dessas moléculas causa graves lesões celulares. O ROS é capaz de desencadear apoptose não só em neutrófilos, mas em macrófagos, hepatócitos, células neuronais, entre outros tipos celulares (CHANDRA et al., 2000). Em nossos resultados há a possibilidade do heme ter liberado seu átomo de ferro central, capaz de reagir com H₂O₂ (reação de Fenton) e gerar radicais hidroxilas (OH[•]), que medeiam a apoptose. Dados publicados comprovam a associação de OH[•], pela reação de Fenton, com apoptose de neutrófilos, uma vez que o uso de quelantes de ferro pôde reverter esse efeito (ROLLET-LABELLE et al., 1998).

Entretanto, não podemos excluir a possibilidade do heme provocar outro tipo de morte celular programada, a necroptose, já que observamos ainda um pequeno percentual de neutrófilos em apoptose tardia/necrose secundária. A necroptose é descrita como uma necrose regulada por vias de sinalização específicas, envolvendo especialmente a proteína quinase RIP1 (*kinases receptor interacting protein*) (VANDENABEELE et al., 2010). Esse tipo de morte já foi demonstrado em macrófagos tratados com heme mediante a produção de ROS e TNF-α (FORTES et al., 2012), mas até o momento isso não foi explorado em neutrófilos.

Analisando a morte celular de neutrófilos na infecção por *L. chagasi* em ausência de heme, o parasita não interfere na longevidade dessas células, diferente da

infecção por outras espécies de *Leishmania*, como a *L. major*, em que a sua interação com neutrófilos culmina na apoptose dessas células (LAUFS et al., 2002). Dados recentes publicados pelo nosso grupo mostraram que a saliva do vetor *Lutzomyia longipalpis* exacerba a apoptose em neutrófilos murinos infectados por *L. chagasi* (PRATES et al., 2011). Futuramente, será interessante abordar se a saliva é capaz de modular a apoptose de neutrófilos infectados em presença do heme, pois estaríamos mimetizando as condições presentes no lago sanguíneo durante a picada do flebótomo.

A partir dos dados demonstrados de que durante a infecção por *L. chagasi* em neutrófilos humanos a presença do heme leva a ativação dessas células ao mesmo tempo que induz apoptose nas mesmas, esses eventos biológicos poderiam ter implicações distintas em relação a interferência na carga parasitária. Uma vez que, neutrófilos ativados são eficientes na morte do parasita e neutrófilos apoptóticos favorecem o estabelecimento da *Leishmania* (ROUSSEAU et al., 2001; LASKAY et al., 2003). A interação *Leishmania* e heme tem evidenciado que ela pode favorecer o crescimento do parasita devido ao heme ser utilizado como fator nutricional (CARVALHO et al., 2009; HUYNH et al., 2012). Para nossa surpresa, o heme não interferiu significativamente na taxa de infecção de neutrófilos humanos por *L. chagasi*, nem no número de amastigotas por célula, mas favoreceu a proliferação dos parasitas, visto que na contagem das formas promastigotas viáveis liberadas no meio Schneider, a presença do heme modulou positivamente o crescimento da *Leishmania*.

O heme tem participação em várias vias metabólicas essenciais para esses protozoários, principalmente na síntese de heme-proteínas, como os citocromos. Entretanto, os Tripanossomatídeos de modo geral, perderam parcialmente a capacidade de biossíntese do heme, portanto necessitam captar essa molécula do meio exógeno (TRIPODI et al., 2011).

Durante o curso da LV o parasita poderia ter fácil acesso ao heme devido as alterações hematológicas ou a partir de heme-proteínas provenientes de dano tecidual. Dados não publicados do nosso grupo indicam que os níveis de heme estão aumentados em pacientes sintomáticos quando comparados aos de indivíduos assintomáticos da mesma área endêmica. Nesse contexto, indivíduos com LV teriam uma maior disponibilização de heme para a célula hospedeira. Além disso, macrófagos ou neutrófilos infectados poderiam fagocitar hemácias no baço de pacientes com LV, facilitando a endocitose da hemoglobina e utilização do heme pela *Leishmania*. Estudos

anteriores já revelaram que promastigotas de *L. donovani* expressam receptores específicos para hemoglobina na bolsa flagelar (SENGUPTA et al., 1999).

Com isso, uma possível explicação para que o heme extracelular adicionado a infecção dos neutrófilos esteja aumentando a proliferação da *L. chagasi*, é que ele pode estar sendo consumido como fonte de ferro (HUYNH et al., 2006; CARVALHO et al., 2009).

O ferro é um cofator para várias enzimas e processos biológicos, indispensável para o crescimento de microrganismos. Em condições de baixa disponibilidade de ferro, foi necessário desenvolver mecanismos capazes de facilitar o armazenamento do metal. Entre estes mecanismos, temos o transporte de moléculas que possuem o ferro em sua composição, como heme ou heme-proteínas. Em 2009, Carvalho e colaboradores relataram que amastigotas de *L. infantum* possuem um ligante na sua superfície com alta afinidade pelo heme. Esse ligante pode ter a função de transportador intracelular do heme, como uma forma indireta para internalizar o ferro (CARVALHO et al., 2009). Da mesma forma, é possível que o heme durante a infecção dos neutrófilos tenha sido degradado, liberando o ferro. Isso permitiria a *L. chagasi* captar o Fe^{+2} gerado a partir do Fe^{+3} por atividade da sua NADPH redutase (WILSON et al., 2002).

Seja de forma direta ou indireta, o aumento de absorção de ferro pelo parasita favorece sua proliferação. O gene *Nramp1* (proteína 1 do macrófago associada a resistência natural) codifica uma proteína presente em fagolisossomos de macrófagos, que bombeia íons de Fe^{+2} para o citoplasma celular, diminuindo a sua quantidade dentro do fagolisossomo (JABADO et al., 2000). Esse gene é associado à susceptibilidade do hospedeiro a diversas infecções, como por exemplo, por *Leishmania*, onde mutações em *Nramp1* prejudica a capacidade de macrófagos em inibir o crescimento intracelular do patógeno (FORBES & GROS, 2001). Isso evidencia que o *Nramp1* funciona como uma defesa da célula hospedeira em tentar restringir o acesso de patógenos ao ferro. Entretanto, foi descoberto em amastigotas de *L. amazonensis* um transportador de Fe^{+2} , denominado LIT1, que proporcionou uma adaptação a esse ambiente por possibilitar a captação direta do Fe^{+2} , além de ser indispensável para replicação e virulência do parasita (HUYNH et al., 2006). Esse grupo ainda descreveu em 2012, na mesma espécie de *Leishmania*, a existência de uma proteína transmembrana transportadora de heme (HUYNH et al., 2012). Contudo, estudos sobre a existência de análogos de transportadores de ferro e heme ainda não foram descritos para *L. chagasi*.

Outras infecções por Tripanossomatídeos, a exemplo do *T. cruzi*, também sugerem o ferro como elemento crucial para o parasitismo (PAIVA et al., 2012), uma vez que o uso de quelantes de ferro reduziu a infecção em macrófagos e camundongos (ARANTES et al., 2007; PAIVA et al., 2012).

A ideia do ferro como fonte nutricional, foi corroborada quando utilizamos o Fe^{+2} em nossas culturas. Além do Fe^{+2} , utilizamos a PPIX por também estar presente na composição do heme. As duas moléculas aumentaram o crescimento da *L. chagasi* em neutrófilos de modo similar ao tratamento com heme. Em *L. chagasi* a captação do ferro ocorre preferencialmente na forma Fe^{+2} (WILSON et al., 2002) e o tratamento com o próprio íon deve facilitar o seu uso em vias de proliferação, contribuindo para o estabelecimento da infecção. O anel de PPIX pode estar sendo incorporado a outros metais, como o zinco, manganês e cobalto, os quais também se mostram importantes para reações celulares vitais (COWAN, 1997).

Embora a PPIX e o Fe^{+2} contribuam para a replicação parasitária assim como o heme, em relação à atividade das enzimas neutrofílicas o efeito não é o mesmo. Diferente dos efeitos induzidos pelo heme, a presença do Fe^{+2} ou da PPIX não alterou as atividades das enzimas MPO e NE em neutrófilos infectados por *L. chagasi*. Estudos com heme e PPIX em macrófagos murinos apresentaram efeito antagônico quanto à produção de $\text{TNF-}\alpha$, indicando que esse efeito depende da presença do ferro (FIGUEIREDO et al., 2007). Contudo, a PPIX demonstrou uma capacidade correspondente a do heme em induzir a quimiotaxia dos neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (PORTO et al., 2007). Nos nossos resultados, o indicativo é que o heme e a PPIX apesar de exibirem resultado semelhante sobre o parasita, agem de modo diferente sobre a fisiologia do neutrófilo. O mesmo é válido para o Fe^{+2} .

A persistência da *Leishmania* em meio à atividade pró-inflamatória de neutrófilos supõe a existência de mecanismos compensatórios que proporcionam o crescimento do patógeno. Essa atividade neutrofílica ocasionada pelo heme contribui para manutenção de muitas doenças, tendo na maior parte dos casos a HO-1 e seus produtos da degradação do heme como fator chave para a resolução da inflamação (PAE & CHUNG, 2009). No contexto de doenças parasitárias, o heme parece ter um papel protetor para o parasita através da indução de mecanismos anti-inflamatórios, principalmente a heme-oxigenase 1 (HO-1). Em malária, o aumento da parasitemia em camundongos por *P. yoelii* foi associada positivamente a atividade da HO-1 induzida pelo heme (DEY et al., 2012). Na Leishmaniose Visceral, o nosso grupo mostrou que

HO-1 aumenta a carga parasitária de *L. chagasi* reduzindo a resposta leishmanicida dos macrófagos (LUZ et al., 2012). Entretanto, embora tenhamos feito várias tentativas, não conseguimos detectar a atividade da HO-1 no lisado de neutrófilos infectados por *L. chagasi* na ausência ou presença de heme (dados não mostrados). Por isso fomos averiguar a existência de outros mediadores que pudessem estar contribuindo para favorecer a infecção de neutrófilos pela *L. chagasi*.

O TGF- β é uma importante molécula anti-inflamatória que determina a suscetibilidade em infecções por *Leishmania* (BARRAL-NETTO et al., 1992). A presença do heme em cultura de neutrófilos infectados por *L. chagasi* resultou na liberação de TGF- β , o que não ocorreu após o tratamento com a PPIX ou o Fe⁺². Esse TGF- β pode ser importante durante a interação dos neutrófilos apoptóticos com os macrófagos, por desativar as vias pró-inflamatórias dessas células, facilitando o estabelecimento da *Leishmania* em sua principal célula hospedeira (AFONSO et al., 2008).

Antioxidantes também proporcionam um balanço em ambientes inflamatórios, amenizando os efeitos deletérios do ROS. Nos nossos resultados, observamos que o heme provoca uma forte resposta oxidativa nos neutrófilos infectados, não sendo o suficiente para controlar a infecção.

O ânion superóxido (O₂⁻) está incluso entre as espécies reativas de oxigênio com alta toxicidade. O O₂⁻ pode causar a libertação de íons de Fe⁺² e com isso sustentar a geração de mais espécies reativas de oxigênio, através da reação de Fenton. A enzima superóxido dismutase (SOD) surge como um importante mecanismo de defesa antioxidante, por catalisar a dismutação do O₂⁻ em oxigênio e peróxido de hidrogênio (FUKAI & USHIO-FUKAI, 2011). Atualmente, existem 3 principais tipos de SOD caracterizados de acordo com o metal necessário para sua ativação: cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) (PERRY et al., 2010).

Já foi confirmado que algumas espécies de *Leishmania* possuem o gene da SOD, identificado inicialmente em *L. chagasi* (PARAMCHUK et al., 1997). A atividade da SOD em protozoários requer a presença de ferro (FeSOD) e pode agir como defesa desses microrganismos ao estresse oxidativo, visto que amastigotas de *L. donovani* deficientes em produção de SOD sobrevivem menos dentro de macrófagos (GHOSH et al., 2003). Recentemente, a expressão de FeSOD ainda foi associada a diferenciação de *L. amazonensis* em amastigotas. A FeSOD foi modulada por atividade do LIT1

(transportador de Fe^{+2}), promovendo a transformação de promastigotas em amastigotas por conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio (MITTRA et al., 2013).

Em determinadas condições, a produção de SOD pela célula hospedeira proporciona proteção ao patógeno. As células humanas possuem Cu/Zn-SOD (citoplasmática) e Mn-SOD (mitocondrial) (FUKAI & USHIO-FUKAI, 2011). A Cu/Zn-SOD conhecida como SOD-1, beneficiou a infecção por *L. amazonensis* em macrófagos humanos por diminuir a quantidade do íon superóxido dentro das células. A confirmação veio com a utilização do inibidor da SOD, o DETC, que aumentou a liberação de superóxido e eliminou a infecção intracelular de macrófagos (KHOURI et al., 2009).

Em nossos ensaios, a infecção por *L. chagasi* não modificou a atividade da SOD nos neutrófilos humanos, mas a presença do heme e do Fe^{+2} junto a infecção aumentaram a atividade da enzima. Acreditamos que a atividade predominante seja da SOD-1, mas como o kit utilizado é capaz de detectar a atividade de diferentes tipos de SOD, não podemos descartar a possibilidade da SOD do parasita também esta respondendo ao estímulo do heme ou do Fe^{+2} , balanceando o efeito leishmanicida do ROS.

Para testar a hipótese que a SOD esta favorecendo a replicação da *L. chagasi* dentro do neutrófilo ativado, utilizamos o DETC (inibidor da atividade da SOD). O uso do DETC, independente da presença do heme ou do Fe^{+2} , claramente reduz o crescimento da *L. chagasi* em comparação ao grupos que não foram tratados com o inibidor. O DETC provavelmente aumenta a liberação do superóxido, como visto na infecção *in vivo* por *L. braziliensis* e *in vitro* por *L. amazonensis* (KHOURI et al., 2010), ocasionando a morte dos parasitas por inibir o mecanismo compensatório ao estresse oxidativo.

Nossos achados corroboram com os dados de literatura sobre o potencial inflamatório do heme em neutrófilos, aqui observados durante a infecção por *L. chagasi*. A maior parte desses neutrófilos estavam em apoptose, talvez pelo efeito deletério do heme ou devido a forte ativação neutrofílica. Foi mostrado que essa ativação neutrofílica não foi suficiente para controlar a carga parasitária, sugerindo uso do heme e do Fe^{+2} pela *Leishmania* como fator nutricional junto a presença de mediadores anti-inflamatórios e antioxidantes. A SOD aparece demonstrando um maior envolvimento, visto que a inibição da sua atividade pelo DETC controlou o crescimento parasitário em neutrófilos, mesmo em presença do heme ou do Fe^{+2} . Em conjunto, esses

resultados levantam novos questionamentos sobre a resistência da *Leishmania* em ambientes inflamatórios, a existência de mecanismos de defesa que permitem a *Leishmania* estabelecer a infecção e possíveis intervenções terapêuticas para avanços no tratamento de pacientes com LV.

CONCLUSÕES

1. O heme favorece ativação de neutrófilos humanos infectados com *L. chagasi* através da liberação de enzimas dos grânulos, ROS e LTB₄;
2. O heme induz apoptose em neutrófilos humanos infectados por *L. chagasi*;
3. A proliferação da *L. chagasi* é aumentada pelo heme, bem como pelo tratamento com PPIX ou Fe⁺²;
4. A produção de TGF-β e SOD são mecanismos compensatórios para sobrevivência da *L. chagasi* em neutrófilos ativados pelo heme;
5. O uso do DETC controla a replicação da *L. chagasi* em neutrófilos humanos em presença do heme ou do Fe⁺².

Conclusão geral

O heme induz a ativação de neutrófilos humanos durante a infecção por *L. chagasi*, ao mesmo tempo em que favorece a proliferação do parasita, possivelmente, por contribuir para a disponibilidade de ferro como nutriente e pela ativação de mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes, via TGF-β e SOD, respectivamente.

REFERÊNCIAS

ABDELMOULA, M. S.;M'HAMDI, Z.;AMRI, F.;TEBIB, N.;BEN TURKIA, H.; BEN DRIDI, M. F. [Visceral leishmaniasis in children: prognostic factors]. **Tunis Med**, v.81, n.8, Aug, p.535-9. 2003.

AFONSO, L.;BORGES, V. M.;CRUZ, H.;RIBEIRO-GOMES, F. L.;DOSREIS, G. A.;DUTRA, A. N.;CLARENCIO, J.;DE OLIVEIRA, C. I.;BARRAL, A.;BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J Leukoc Biol**, v.84, n.2, Aug, p.389-96. 2008.

AJIOKA, R. S.;PHILLIPS, J. D.; KUSHNER, J. P. Biosynthesis of heme in mammals. **Biochim Biophys Acta**, v.1763, n.7, Jul, p.723-36. 2006.

ANDRADE, B. B.;ARAUJO-SANTOS, T.;LUZ, N. F.;KHOURI, R.;BOZZA, M. T.;CAMARGO, L. M.;BARRAL, A.;BORGES, V. M.; BARRAL-NETTO, M. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. **J Immunol**, v.185, n.2, Jul 15, p.1196-204. 2010.

ANDRADE, T. M.;CARVALHO, E. M.; ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.162, n.6, Dec, p.1354-9. 1990.

APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends Microbiol**, v.15, n.2, Feb, p.87-92. 2007.

ARANTES, J. M.;PEDROSA, M. L.;MARTINS, H. R.;VELOSO, V. M.;DE LANA, M.;BAHIA, M. T.;TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Trypanosoma cruzi: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. **Exp Parasitol**, v.117, n.1, Sep, p.43-50. 2007.

ARRUDA, M. A.;BARCELLOS-DE-SOUZA, P.;SAMPAIO, A. L.;ROSSI, A. G.;GRACA-SOUZA, A. V.; BARJA-FIDALGO, C. NADPH oxidase-derived ROS: key modulators of heme-induced mitochondrial stability in human neutrophils. **Exp Cell Res**, v.312, n.19, Nov 15, p.3939-48. 2006.

ARRUDA, M. A.;ROSSI, A. G.;DE FREITAS, M. S.;BARJA-FIDALGO, C.; GRACA-SOUZA, A. V. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. **J Immunol**, v.173, n.3, Aug 1, p.2023-30. 2004.

BARRAL-NETTO, M.;BARRAL, A.;BROWNELL, C. E.;SKEIKY, Y. A.;ELLINGSWORTH, L. R.;TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth

factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v.257, n.5069, Jul 24, p.545-8. 1992.

BELCHER, J. D.;BECKMAN, J. D.;BALLA, G.;BALLA, J.; VERCELLOTTI, G. Heme degradation and vascular injury. **Antioxid Redox Signal**, v.12, n.2, Feb, p.233-48. 2010.

BELIC, A.;PEJIN, D.;STEFANOVIC, N.;SPASOJEVIC, J.; DURKOVIC, D. [Hematologic characteristics of leishmaniasis]. **Med Pregl**, v.53, n.1-2, Jan-Feb, p.89-91. 2000.

BOGDAN, C.;DONHAUSER, N.;DORING, R.;ROLLINGHOFF, M.;DIEFENBACH, A.; RITTIG, M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. **J Exp Med**, v.191, n.12, Jun 19, p.2121-30. 2000.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v.33, n.5, Nov 24, p.657-70. 2010.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v.89, n.10, May 15, p.3503-21. 1997.

BRINKMANN, V.;REICHARD, U.;GOOSMANN, C.;FAULER, B.;UHLEMANN, Y.;WEISS, D. S.;WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v.303, n.5663, Mar 5, p.1532-5. 2004.

CARVALHO, S.;CRUZ, T.;SANTAREM, N.;CASTRO, H.;COSTA, V.; TOMAS, A. M. Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. **Acta Trop**, v.109, n.2, Feb, p.131-5. 2009.

CHANDRA, J.;SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v.29, n.3-4, Aug, p.323-33. 2000.

CHAPPUIS, F.;SUNDAR, S.;HAILU, A.;GHALIB, H.;RIJAL, S.;PEELING, R. W.;ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.11, Nov, p.873-82. 2007.

CHARMOY, M.;AUDERSET, F.;ALLENBACH, C.; TACCHINI-COTTIER, F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **J Biomed Biotechnol**, v.2010, p.719361. 2010.

COSGROVE, S.;CHOTIRMALL, S. H.;GREENE, C. M.; MCELVANEY, N. G. Pulmonary proteases in the cystic fibrosis lung induce interleukin 8 expression from

bronchial epithelial cells via a heme/meprin/epidermal growth factor receptor/Toll-like receptor pathway. **J Biol Chem**, v.286, n.9, Mar 4, p.7692-704. 2011.

COWAN, J. A. Inorganic Biochemistry: An Introduction. New York: Wiley-VCH, v.2nd ed. 1997

DABOUL, M. W. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. **East Mediterr Health J**, v.16, n.10, Oct, p.1055-8. 2010.

DAL-SECCO, D.;FREITAS, A.;ABREU, M. A.;GARLET, T. P.;ROSSI, M. A.;FERREIRA, S. H.;SILVA, J. S.;ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q. Reduction of ICAM-1 expression by carbon monoxide via soluble guanylate cyclase activation accounts for modulation of neutrophil migration. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.381, n.6, Jun, p.483-93. 2010.

DALE, D. C.;BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v.112, n.4, Aug 15, p.935-45. 2008.

DEY, S.;BINDU, S.;GOYAL, M.;PAL, C.;ALAM, A.;IQBAL, M. S.;KUMAR, R.;SARKAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Impact of intravascular hemolysis in malaria on liver dysfunction: involvement of hepatic free heme overload, NF-kappaB activation, and neutrophil infiltration. **J Biol Chem**, v.287, n.32, Aug 3, p.26630-46. 2012.

EL KEBIR, D.; FILEP, J. G. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. **ScientificWorldJournal**, v.10, p.1731-48. 2010.

EXNER, M.;MINAR, E.;WAGNER, O.; SCHILLINGER, M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. **Free Radic Biol Med**, v.37, n.8, Oct 15, p.1097-104. 2004.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, v.5, n.14, Nov, p.1317-27. 2003.

FIGUEIREDO, R. T.;FERNANDEZ, P. L.;MOURAO-SA, D. S.;PORTO, B. N.;DUTRA, F. F.;ALVES, L. S.;OLIVEIRA, M. F.;OLIVEIRA, P. L.;GRACA-SOUZA, A. V.; BOZZA, M. T. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v.282, n.28, Jul 13, p.20221-9. 2007.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Trends Microbiol**, v.9, n.8, Aug, p.397-403. 2001.

FORTES, G. B.;ALVES, L. S.;DE OLIVEIRA, R.;DUTRA, F. F.;RODRIGUES, D.;FERNANDEZ, P. L.;SOUTO-PADRON, T.;DE ROSA, M. J.;KELLIHER, M.;GOLENBOCK, D.;CHAN, F. K.; BOZZA, M. T. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. **Blood**, v.119, n.10, Mar 8, p.2368-75. 2012.

FOX, S.;LEITCH, A. E.;DUFFIN, R.;HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **J Innate Immun**, v.2, n.3, p.216-27. 2010.

FREITAS, A.;ALVES-FILHO, J. C.;SECCO, D. D.;NETO, A. F.;FERREIRA, S. H.;BARJA-FIDALGO, C.; CUNHA, F. Q. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **Br J Pharmacol**, v.149, n.4, Oct, p.345-54. 2006.

FREITAS, A.;ALVES-FILHO, J. C.;TREVELIN, S. C.;SPILLER, F.;SUAVINHA, M. M.;NASCIMENTO, D. C.;PESTANA, C. R.;DAL-SECCO, D.;SONEGO, F.;CZAIKOSKI, P. G.;CURTI, C.;BARJA-FIDALGO, C.; CUNHA, F. Q. Divergent role of heme oxygenase inhibition in the pathogenesis of sepsis. **Shock**, v.35, n.6, Jun, p.550-9. 2011.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid Redox Signal**, v.15, n.6, Sep 15, p.1583-606. 2011.

GABRIEL, C.;MCMASTER, W. R.;GIRARD, D.; DESCOTEAUX, A. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J Immunol**, v.185, n.7, Oct 1, p.4319-27. 2010.

GHOSH, S.;GOSWAMI, S.; ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of Leishmania within the macrophage. **Biochem J**, v.369, n.Pt 3, Feb 1, p.447-52. 2003.

GOZZELINO, R.;JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.50, p.323-54. 2010.

GRACA-SOUZA, A. V.;ARRUDA, M. A.;DE FREITAS, M. S.;BARJA-FIDALGO, C.; OLIVEIRA, P. L. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. **Blood**, v.99, n.11, Jun 1, p.4160-5. 2002.

GUERIN, P. J.;OLLIARO, P.;SUNDAR, S.;BOELAERT, M.;CROFT, S. L.;DESJEUX, P.;WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**, v.2, n.8, Aug, p.494-501. 2002.

GUIMARAES-COSTA, A. B.;NASCIMENTO, M. T.;FROMENT, G. S.;SOARES, R. P.;MORGADO, F. N.;CONCEICAO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.16, Apr 21, p.6748-53. 2009.

HUYNH, C.;SACKS, D. L.; ANDREWS, N. W. A Leishmania amazonensis ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. **J Exp Med**, v.203, n.10, Oct 2, p.2363-75. 2006.

HUYNH, C.;YUAN, X.;MIGUEL, D. C.;RENBURG, R. L.;PROTCHENKO, O.;PHILPOTT, C. C.;HAMZA, I.; ANDREWS, N. W. Heme uptake by Leishmania amazonensis is mediated by the transmembrane protein LHR1. **PLoS Pathog**, v.8, n.7, p.e1002795. 2012.

JABADO, N.;JANKOWSKI, A.;DOUGAPARSAD, S.;PICARD, V.;GRINSTEIN, S.; GROS, P. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. **J Exp Med**, v.192, n.9, Nov 6, p.1237-48. 2000.

JENEY, V.;BALLA, J.;YACHIE, A.;VARGA, Z.;VERCELLOTTI, G. M.;EATON, J. W.; BALLA, G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Blood**, v.100, n.3, Aug 1, p.879-87. 2002.

KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clin Microbiol Infect**, v.17, n.10, Oct, p.1462-70. 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. Hum Vaccin. 7: 1204-14 p. 2011.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol Res**, v.43, n.1-3, p.25-61. 2009.

KHOURI, R.;BAFICA, A.;SILVA MDA, P.;NORONHA, A.;KOLB, J. P.;WIETZERBIN, J.;BARRAL, A.;BARRAL-NETTO, M.; VAN WEYENBERGH, J. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **J Immunol**, v.182, n.4, Feb 15, p.2525-31. 2009.

KHOURI, R.;NOVAIS, F.;SANTANA, G.;DE OLIVEIRA, C. I.;VANNIER DOS SANTOS, M. A.;BARRAL, A.;BARRAL-NETTO, M.; VAN WEYENBERGH, J. DETC induces Leishmania parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. **PLoS One**, v.5, n.12, p.e14394. 2010.

KIM, D.; HAYNES, C. L. Neutrophil chemotaxis within a competing gradient of chemoattractants. **Anal Chem**, v.84, n.14, Jul 17, p.6070-8. 2012.

KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front Biosci**, v.13, p.2400-7. 2008.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.13, n.3, Mar, p.159-75. 2013.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, Dec, p.811-27. 2005.

LARSEN, R.;GOUVEIA, Z.;SOARES, M. P.; GOZZELINO, R. Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. **Front Pharmacol**, v.3, p.77. 2012.

LARSEN, R.;GOZZELINO, R.;JENEY, V.;TOKAJI, L.;BOZZA, F. A.;JAPIASSU, A. M.;BONAPARTE, D.;CAVALCANTE, M. M.;CHORA, A.;FERREIRA, A.;MARGUTI, I.;CARDOSO, S.;SEPULVEDA, N.;SMITH, A.; SOARES, M. P. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. **Sci Transl Med**, v.2, n.51, Sep 29, p.51ra71. 2010.

LASKAY, T.;VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol**, v.11, n.5, May, p.210-4. 2003.

LAUFS, H.;MULLER, K.;FLEISCHER, J.;REILING, N.;JAHNKE, N.;JENSENIUS, J. C.;SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect Immun**, v.70, n.2, Feb, p.826-35. 2002.

LI, X.;SCHWACHA, M. G.;CHAUDRY, I. H.; CHOUDHRY, M. A. Heme oxygenase-1 protects against neutrophil-mediated intestinal damage by down-regulation of neutrophil p47phox and p67phox activity and O₂- production in a two-hit model of alcohol intoxication and burn injury. **J Immunol**, v.180, n.10, May 15, p.6933-40. 2008.

LIMA, G. M.;VALLOCHI, A. L.;SILVA, U. R.;BEVILACQUA, E. M.;KIFFER, M. M.; ABRAHAMSOHN, I. A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous *Leishmaniasis*. **Immunol Lett**, v.64, n.2-3, Dec, p.145-51. 1998.

LUM, A. F.;WUN, T.;STAUNTON, D.; SIMON, S. I. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. **Am J Hematol**, v.76, n.2, Jun, p.126-33. 2004.

LUZ, N. F.;ANDRADE, B. B.;FEIJO, D. F.;ARAUJO-SANTOS, T.;CARVALHO, G. Q.;ANDRADE, D.;ABANADES, D. R.;MELO, E. V.;SILVA, A. M.;BRODSKYN, C. I.;BARRAL-NETTO, M.;BARRAL, A.;SOARES, R. P.;ALMEIDA, R. P.;BOZZA, M. T.; BORGES, V. M. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J Immunol**, v.188, n.9, May 1, p.4460-7. 2012.

MAITRA, D.;BYUN, J.;ANDREANA, P. R.;ABDULHAMID, I.;SAED, G. M.;DIAMOND, M. P.;PENNATHUR, S.; ABU-SOUD, H. M. Mechanism of hypochlorous acid-mediated heme destruction and free iron release. **Free Radic Biol Med**, v.51, n.2, Jul 15, p.364-73. 2011.

MANCUSO, P.;NANA-SINKAM, P.; PETERS-GOLDEN, M. Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun**, v.69, n.4, Apr, p.2011-6. 2001.

MCFARLANE, E.;PEREZ, C.;CHARMOY, M.;ALLENBACH, C.;CARTER, K. C.;ALEXANDER, J.; TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infect Immun**, v.76, n.2, Feb, p.532-41. 2008.

MINISTÉRIODASAÚDE. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral, disponível em disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31941, acesso 26/04/2013. 2011.

MITTRA, B.;CORTEZ, M.;HAYDOCK, A.;RAMASAMY, G.;MYLER, P. J.; ANDREWS, N. W. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. **J Exp Med**, v.210, n.2, Feb 11, p.401-16. 2013.

MONTEIRO, A. P.;PINHEIRO, C. S.;LUNA-GOMES, T.;ALVES, L. R.;MAYA-MONTEIRO, C. M.;PORTO, B. N.;BARJA-FIDALGO, C.;BENJAMIM, C. F.;PETERS-GOLDEN, M.;BANDEIRA-MELO, C.;BOZZA, M. T.; CANETTI, C. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. **J Immunol**, v.186, n.11, Jun 1, p.6562-7. 2011.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol**, v.10, n.2, Feb, p.301-8. 2008.

NOHGAWA, M.;SASADA, M.;MAEDA, A.;ASAGOE, K.;HARAKAWA, N.;TAKANO, K.;YAMAMOTO, K.; OKUMA, M. Leukotriene B₄-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. **J Leukoc Biol**, v.62, n.2, Aug, p.203-9. 1997.

NOVAIS, F. O.;SANTIAGO, R. C.;BAFICA, A.;KHOURI, R.;AFONSO, L.;BORGES, V. M.;BRODSKYN, C.;BARRAL-NETTO, M.;BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **J Immunol**, v.183, n.12, Dec 15, p.8088-98. 2009.

OTTERBEIN, L. E.;SOARES, M. P.;YAMASHITA, K.; BACH, F. H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends Immunol**, v.24, n.8, Aug, p.449-55. 2003.

PAE, H. O.; CHUNG, H. T. Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. **Immune Netw**, v.9, n.1, Feb, p.12-9. 2009.

PAIVA, C. N.;FEIJO, D. F.;DUTRA, F. F.;CARNEIRO, V. C.;FREITAS, G. B.;ALVES, L. S.;MESQUITA, J.;FORTES, G. B.;FIGUEIREDO, R. T.;SOUZA, H. S.;FANTAPPIE, M. R.;LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M. T. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Clin Invest**, v.122, n.7, Jul 2, p.2531-42. 2012.

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

PAOLI, M.;MARLES-WRIGHT, J.; SMITH, A. Structure-function relationships in heme-proteins. **DNA Cell Biol**, v.21, n.4, Apr, p.271-80. 2002.

PARAMCHUK, W. J.;ISMAIL, S. O.;BHATIA, A.; GEDAMU, L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, v.90, n.1, Dec 1, p.203-21. 1997.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol**, v.127, n.4, Oct, p.1438-43. 1981.

PERRY, J. J.;SHIN, D. S.;GETZOFF, E. D.; TAINER, J. A. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochim Biophys Acta**, v.1804, n.2, Feb, p.245-62. 2010.

PETERS, N. C.;EGEN, J. G.;SECUNDINO, N.;DEBRABANT, A.;KIMBLIN, N.;KAMHAWI, S.;LAWYER, P.;FAY, M. P.;GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v.321, n.5891, Aug 15, p.970-4. 2008.

PHAM, C. T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.7, Jul, p.541-50. 2006.

PHAM, C. T. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. **Int J Biochem Cell Biol**, v.40, n.6-7, p.1317-33. 2008.

PHAM, N. K.;MOURIZ, J.; KIMA, P. E. Leishmania pifanoi amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infect Immun**, v.73, n.12, Dec, p.8322-33. 2005.

PORTO, B. N.;ALVES, L. S.;FERNANDEZ, P. L.;DUTRA, T. P.;FIGUEIREDO, R. T.;GRACA-SOUZA, A. V.; BOZZA, M. T. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. **J Biol Chem**, v.282, n.33, Aug 17, p.24430-6. 2007.

PRATES, D. B.;ARAÚJO-SANTOS, T.;LUZ, N. F.;FRANCA-COSTA, J.;ANDRADE, B. B.;CLARÊNCIO, J.;MIRANDA, J. C.;BOZZA, P. T.;DOSREIS, G. A.;BRODSKYN, C. L.;BARRAL-NETTO, M.;BORGES, V. M.; BARRAL, A. Lutzomyia longipalpis saliva triggers apoptosis and modifies the inflammatory response of neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**. 2011.

RIBEIRO-GOMES, F. L.;OTERO, A. C.;GOMES, N. A.;MONIZ-DE-SOUZA, M. C.;CYSNE-FINKELSTEIN, L.;ARNHOLDT, A. C.;CALICH, V. L.;COUTINHO, S. G.;LOPES, M. F.; DOSREIS, G. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection. **J Immunol**, v.172, n.7, Apr 1, p.4454-62. 2004.

RITTER, U.;FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? **Trends Parasitol**, v.25, n.11, Nov, p.505-10. 2009.

ROLLET-LABELLE, E.;GRANGE, M. J.;ELBIM, C.;MARQUETTY, C.;GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; PASQUIER, C. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v.24, n.4, Mar 1, p.563-72. 1998.

ROUSSEAU, D.;DEMARTINO, S.;FERRUA, B.;MICHIELS, J. F.;ANJUERE, F.;FRAGAKI, K.;LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. In vivo involvement of

polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiol**, v.1, p.17. 2001.

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

SAMPAIO, M. J.;CAVALCANTI, N. V.;ALVES, J. G.;FILHO, M. J.; CORREIA, J. B. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.11, p.e877. 2010.

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **J Leukoc Biol**, v.61, n.4, Apr, p.375-80. 1997.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol**, v.23, p.197-223. 2005.

SEIXAS, E.;GOZZELINO, R.;CHORA, A.;FERREIRA, A.;SILVA, G.;LARSEN, R.;REBELO, S.;PENIDO, C.;SMITH, N. R.;COUTINHO, A.; SOARES, M. P. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.37, Sep 15, p.15837-42. 2009.

SENGUPTA, S.;TRIPATHI, J.;TANDON, R.;RAJE, M.;ROY, R. P.;BASU, S. K.; MUKHOPADHYAY, A. Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46-kDa protein located in the flagellar pocket. **J Biol Chem**, v.274, n.5, Jan 29, p.2758-65. 1999.

SEREZANI, C. H.;PERRELA, J. H.;RUSSO, M.;PETERS-GOLDEN, M.; JANCAR, S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. **J Immunol**, v.177, n.5, Sep 1, p.3201-8. 2006.

SEVERANCE, S.; HAMZA, I. Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. **Chem Rev**, v.109, n.10, Oct, p.4596-616. 2009.

SOARES, M. P.;MARGUTI, I.;CUNHA, A.; LARSEN, R. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? **Curr Opin Pharmacol**, v.9, n.4, Aug, p.482-9. 2009.

SOUZA, C. E.;MAITRA, D.;SAED, G. M.;DIAMOND, M. P.;MOURA, A. A.;PENNATHUR, S.; ABU-SOUD, H. M. Hypochlorous acid-induced heme degradation from lactoperoxidase as a novel mechanism of free iron release and tissue injury in inflammatory diseases. **PLoS One**, v.6, n.11, p.e27641. 2011.

SUMIMOTO, H.;TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. Superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by leukotriene B4. **Biochim Biophys Acta**, v.803, n.4, Apr 16, p.271-7. 1984.

TRIPODI, K. E.;MENENDEZ BRAVO, S. M.; CRICCO, J. A. Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. **Enzyme Res**, v.2011, p.873230. 2011.

TULADHAR, R.;NATARAJAN, G.; SATOSKAR, A. R. Role of co-stimulation in Leishmaniasis. **Int J Biol Sci**, v.7, n.9, p.1382-90. 2011.

VANDENABEELE, P.;GALLUZZI, L.;VANDEN BERGHE, T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.11, n.10, Oct, p.700-14. 2010.

WAGENER, F. A.;VAN BEURDEN, H. E.;VON DEN HOFF, J. W.;ADEMA, G. J.; FIGDOR, C. G. The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. **Blood**, v.102, n.2, Jul 15, p.521-8. 2003a.

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

WALTHER, M.;DE CAUL, A.;AKA, P.;NJIE, M.;AMAMBUA-NGWA, A.;WALTHER, B.;PREDAZZI, I. M.;CUNNINGTON, A.;DEININGER, S.;TAKEM, E. N.;EBONYI, A.;WEIS, S.;WALTON, R.;ROWLAND-JONES, S.;SIRUGO, G.;WILLIAMS, S. M.; CONWAY, D. J. HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. **PLoS Pathog**, v.8, n.3, p.e1002579. 2012.

WHO. The World Health Report Geneva, Switzerland. 2002.

WHO. The World Health Report Geneva,Switzerland. 2008.

WHO. The World Health Report Geneva, Switzerland. 2010.

WILSON, M. E.;LEWIS, T. S.;MILLER, M. A.;MCCORMICK, M. L.; BRITIGAN, B. E. Leishmania chagasi: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. **Exp Parasitol**, v.100, n.3, Mar, p.196-207. 2002.