

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Heme oxigenase-1 na infecção por *Toxoplasma gondii*: funções divergentes no controle do parasitismo *in vitro* e *in vivo*

Ester Cristina Borges Araujo

Uberlândia
Fevereiro – 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Heme oxigenase-1 na infecção por *Toxoplasma gondii*: funções divergentes no controle do parasitismo *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial a obtenção do título de Mestre.

Mestranda: Ester Cristina Borges Araujo
Orientadora: Dra. Neide Maria da Silva

Uberlândia
Fevereiro – 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- A663h Araujo, Ester Cristina Borges, 1987-
 Heme oxigenase-1 na infecção por *Toxoplasma gondii* [manuscrito] : funções divergentes no controle do parasitismo in vitro e in vivo / Ester Cristina Borges Araujo. - 2011.
 73 f. : il.
- Orientadora: Neide Maria da Silva.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
 1. Toxoplasmose - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. I. Silva, Neide Maria da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.993.1

Dedicatória

*À minha avó **Vanda** (in memorian), por ter sido mulher de grande sabedoria e fortaleza, que nunca deixou de buscar novos conhecimentos. Por todo amor que sempre dedicou a mim, por todas as lindas palavras ditas, pelas incontáveis orações, abraços e preocupações. Sei que se orgulharia de mim agora, vovó.*

*Ao meu avô **Kosmo**, mais que um avô, um pai. Obrigada por não medir esforços para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelo exemplo de homem de caráter, honesto e de bom coração. Tudo isso reflete no que sou hoje.*

*À minha mãe, **Vanilda**. Não tenho palavras para descrever como é grande a minha gratidão, amor e orgulho de ser sua filha. Obrigada por sempre me compreender e por me ajudar em tudo que preciso. Tudo que eu sou é resultado do seu amor incondicional por mim e de sua dedicação de uma vida toda às suas filhas!*

Amo vocês sem medida!

*“Quando tudo está perdido, sempre existe um caminho,
Quando tudo está perdido, sempre existe uma luz”*

(Renato Russo)

Agradecimentos

A Deus, pois Ele quem me dá forças para seguir adiante, Ele quem ilumina meus passos e acalma minhas aflições.

*À minha orientadora, **Dra. Neide Maria da Silva**, por ter me “acolhido” na vida acadêmica e ter me ensinado como fazer pesquisa com total ética. Obrigada por me dar a liberdade para que eu lhe falasse os meus erros e as minhas dúvidas, por mais bobas que fossem, durante a realização deste trabalho. Obrigada pela compreensão durante os momentos de dificuldade no decorrer desses anos. Gosto muito de você!*

*À professora **Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva**, pelo imenso auxílio nas reações de ELISA e nas análises estatísticas.*

*À minha irmã, **Clarisa**, pela importância única que tem em minha vida, por ser minha amiga para todo e qualquer momento, por acreditar que eu conseguiria. Amo demais você!*

*À minha família, **Lili, João, Vanderléia, Eduarda, Débora e Ubiracy**. Vocês são minha fortaleza, meu porto seguro. Porque família é tudo!*

*À **Bellisa**, por ter me ensinado pacientemente a trabalhar com cultura de células. Obrigada por sempre se mostrar disponível a me ajudar em todos os experimentos. Obrigada por me ajudar, independente da hora ou do dia!*

À amiga Loyane (Xuxu), por toda a ajuda prestada, todos os “mil” bloquinhos cortados em tão pouco tempo, pelas intermináveis colorações de H&E e reações de imunohistoquímica! Sempre pude contar com você para tudo! Obrigada, por tamanha amizade, Xuxu!!

Ao Paulo Victor, por ajudar em todos, literalmente todos, os experimentos que precisei e pela boa convivência construída durante todos esses anos. Seus esforços foram de grande valia para conclusão deste trabalho!

À Luciana e Angelica por me ajudarem nos sacrifícios de muitos camundongos, mesmo aos feriados! E ao Diego, por me ensinar a difícil tarefa de enrolar os intestinos! Adoro vocês!!

À Letícia Carvalho e ao Lucas, por todo o apoio durante os experimentos!

À amiga Mariana Cardoso, que sempre esteve presente em todos os momentos de Mestrado, por ir ao L&E&A comigo nos finais de semana, por me deixar falar horas e horas sobre o meu trabalho, por escutar as minhas queixas e frustrações, pelas risadas e momentos de descontração! Obrigada, amiga!

Aos amigos Henrique (Zé) e Priscila, por dividirem essa batalha comigo desde a época de graduação! Obrigada por todos os momentos de desabafos e lamentações quando tudo parecia estar dando errado! Gosto muito de vocês, casal amigo!

Ao amigo Silas, que desde a época das disciplinas me ajudava com os artigos, não medindo esforços para isso! Por todas as agradáveis conversas no corredor e por

sempre me mostrar uma visão otimista das coisas. E tudo se resolveu por si só e sozinho...

*Às amigas **Mara Livia** e **Mônica**, que mesmo sendo de áreas tão diferentes da minha, acompanharam tão de perto toda essa jornada! A parte “emocional” do trabalho vocês conhecem bem! E talvez vocês até já entendam um pouco sobre a heme oxigenase e *Toxoplasma gondii*... obrigada, amigas!*

*Ao pessoal do laboratório, **Andressa**, **Breno**, **Celene**, **Flávia**, **Letícia Filice**, **Juliana Gallo**, **Mariana Bodini**, **Mayara**, **Moline**, **Pâmela**, **Rafaela**, **Rômulo**, **Rosiane** e **Susana**, por fazerem da Histologia um ambiente agradável de trabalho!*

*Aos funcionários do laboratório, **Eliete**, **Fabício**, **Juscélia**, **Marcelo Arantes**, **Mariani** e ao **Rui**, pelo carinho e apoio de vocês!*

*A **CAPES**, **FAPEMIG** e **CNPq**, pelo apoio financeiro.*

LISTA DE ABREVIACÕES

ABC – complexo avidina biotina
ALCAM – molécula de adesão celular de leucócitos ativados
ATCC - American Type Culture Collection
CBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
CCR2 – receptor de quimiocina CC 2
CCR7 – receptor de quimiocina CC 7
Células NK – células “natural killer”
Células Treg – células T reguladoras
CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais
CO – monóxido de carbono
CO₂ – dióxido de carbono
CoPPIX – protoporfirina de cobalto IX
DAB – 3,3'-diaminobenzidina
DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO – dimetilsulfóxido
ECM – malária experimental cerebral
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HCV – vírus da hepatite humana
HE – hematoxilina-eosina
HO – heme oxigenase
HO-1 – heme oxigenase-1
HO-1^{-/-} – animais “knockout” para HO-1
HO-1^{+/+} – animais que expressam HO-1
HO-2 – heme oxigenase-2
HO-3 – heme oxigenase-3
IDO – indoleamina 2,3 dioxigenase
IFN- γ – interferon- γ
IgG – imunoglobulina G
IL-1 – interleucina 1
IL-10 – interleucina 10
IL-12 – interleucina 12

IL-6 – interleucina 6

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

LPS – lipopolissacarídeos

MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos-1

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MIF – fator de inibição de migração de macrófagos

MIP-1 α – proteína-1 α inflamatória de macrófago

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

MTT – 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo

Na₂CO₃ – carbonato de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NaNO₂ – nitrito de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NEED – diidroclorido de naftaleno

NO – óxido nítrico

PBS – salina tamponada com fosfato

ROS – espécies reativas de oxigênio

RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640

SNC – sistema nervoso central

SnPPIX – protoporfirina de estanho

TGF- β – fator transformador de crescimento β

TNF – fator de necrose tumoral

VCAM – molécula de adesão celular vascular-1

ZnPPIX – protoporfirina de zinco IX

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 não infectados e tratados por 24 ou 48 horas com ZnPPiX, hemina ou apenas meio de cultura.....	32
Figura 2. Fotomicrografia representativa da morfologia das células incubadas apenas com meio de cultura, ZnPPiX ou hemina por 48 horas.....	33
Figura 3. Efeitos dos tratamentos com ZnPPiX, IFN- γ ou hemina na proliferação total e na porcentagem de macrófagos RAW 264.7 infectados por <i>T. gondii</i> após 24 ou 48 horas de tratamento.....	35
Figura 4. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos estimulados e/ou infectados com <i>T. gondii</i>	37
Figura 5. Níveis de bilirrubina no soro de animais BALB/c e C57BL/6 infectados com 5 cistos de <i>T. gondii</i> e tratados com ZnPPiX, hemina ou apenas com o veículo.....	39
Figura 6. Escores médios de morbidade e alterações de peso corporal de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com ZnPPiX, hemina ou apenas veículo e infectados com 5 cistos da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	42
Figura 7. Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com 5 cistos da cepa ME49 de <i>T. gondii</i> e tratados com ZnPPiX, hemina ou veículo.....	43
Figura 8. Escore inflamatório no pulmão, fígado, intestino delgado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com ZnPPiX, hemina ou veículo e infectados com 5 cistos da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	45
Figura 9. Fotomicrografias representativas do pulmão, fígado e intestino delgado de animais BALB/c e C57BL/6 infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	46
Figura 10. Parasitismo tecidual no pulmão, fígado e intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME49 de <i>T. gondii</i> e tratados com ZnPPiX, veículo ou hemina.....	48
Figura 11. Níveis de citocinas nas amostras de soro dos camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com ZnPPiX, hemina ou veículo aos 12 dias de infecção por via oral com 5 cistos de <i>T. gondii</i>	50

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.2. Ciclo de vida.....	15
1.3. Resposta imune ao parasito	16
1.4. A heme.....	17
1.5. Heme-oxigenase: funções e resposta imune.....	18
1.6. Mecanismos de ação dos produtos finais da atividade de HO-1	21
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Organismos infecciosos.....	24
4.1.1. Manutenção <i>in vitro</i> da cepa RH de <i>T. gondii</i>	24
4.1.2. Manutenção <i>in vivo</i> da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	24
4.2. Cultura de células RAW 264.7	25
4.3. Obtenção de IFN- γ no sobrenadante de células L1210	25
4.4. Análise da viabilidade de células RAW 264.7 tratadas com ZnPPiX ou hemina.....	25
4.5. Análise do efeito de ZnPPiX ou hemina na produção de NO por macrófagos RAW 264.7	26
4.6. Análise do efeito de ZnPPiX, hemina ou IFN- γ na proliferação do parasito em macrófagos RAW 264.7	26
4.7. Determinação dos níveis de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 tratadas com ZnPPiX, hemina, LPS ou IFN- γ e infectadas ou não com <i>T. gondii</i>	27
4.8. Animais experimentais	27
4.9. Inibição ou indução da atividade de HO-1 em camundongos BALB/c e C57BL/6.....	27
4.10. Infecção experimental e coleta do material	28
4.11. Coloração pela Hematoxilina-eosina (HE) para determinação das alterações histológicas nos tecidos	28

4.12. Imunohistoquímica para detecção de parasitos	29
4.13. Análises histológicas	29
4.14. Determinação dos níveis de bilirrubina no soro de animais tratados	30
4.15. Detecção de IFN- γ , TNF, TGF- β , IL-10 e IL-12p70 nas amostras de soro de animais infectados	30
4.16. Análises estatísticas	31
5. RESULTADOS	31
5.1. Viabilidade celular de células RAW 264.7 tratadas com ZnPPiX ou hemina	31
5.2. Taxas de infecção de células RAW 264.7 infectadas com <i>T. gondii</i> e tratadas com ZnPPiX ou hemina	33
5.3. A indução da atividade da HO-1 potencializa a produção de NO em macrófagos murinos RAW 264.7 mesmo na presença de <i>T. gondii</i>	35
5.4. Níveis de bilirrubina no soro de animais tratados com o indutor ou inibidor da HO-1	38
5.5. Parâmetros clínicos e mortalidade dos animais BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i> e tratados com ZnPPiX ou hemina	40
5.6. A atividade da enzima HO-1 não está envolvida nas alterações histológicas desencadeadas pela infecção por <i>T. gondii</i>	42
5.7. A atividade da enzima HO-1 está envolvida no controle de <i>T. gondii</i> no pulmão de animais BALB/c e C57BL/6	45
5.8. Níveis das citocinas, IFN- γ , TNF, TGF- β e IL-10 no soro de animais infectados e tratados com ZnPPiX ou hemina	48
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS	59
9. ANEXO I	72

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório que induz uma resposta imune do tipo Th1 em seus hospedeiros. O parasito tem uma ampla distribuição mundial, sendo que as formas mais graves da doença ocorrem principalmente em indivíduos imunocomprometidos. A heme oxigenase-1 (HO-1) é a enzima responsável pelo catabolismo da heme livre, um composto capaz de induzir uma intensa resposta inflamatória. Além disso, a expressão de HO-1 é induzida diante de vários estímulos, desencadeando uma resposta anti-inflamatória em situações de estresse biológico. Com o objetivo de investigar o papel da HO-1 na infecção por *T. gondii*, macrófagos RAW 264.7 foram infectados com parasitos da cepa RH e tratados com protoporfirina de zinco IX (ZnPPIX) ou hemina, os quais inibem ou induzem a atividade de HO-1, respectivamente. Para verificação do papel da HO-1 na infecção *in vivo*, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com ZnPPIX ou hemina. Os resultados mostraram que a inibição de HO-1 diminuiu o parasitismo nos macrófagos RAW 264.7, sendo que esse mecanismo parece ser independente de óxido nítrico (NO), uma vez que o tratamento com ZnPPIX não alterou os níveis de produção de NO. Além disso, macrófagos infectados, estimulados com IFN- γ e tratados com hemina mostraram um aumento na produção de NO. No entanto, essas células quando infectadas e tratadas apenas com hemina apresentaram uma maior replicação do parasito. Durante a infecção *in vivo*, observou-se que a atividade de HO-1 não ocasionou alterações expressivas na patologia dos órgãos periféricos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *T. gondii*. Apesar disso, camundongos de ambas as linhagens tratados com ZnPPIX apresentaram maior parasitismo tecidual no pulmão, enquanto que o tratamento com hemina diminuiu a replicação do parasito no intestino e pulmão de camundongos C57BL/6. A mensuração de citocinas (IFN- γ , TNF, TGF- β e IL-10) no soro dos animais infectados e tratados com hemina ou ZnPPIX mostrou que a indução ou inibição de HO-1 não altera significativamente os níveis sorológicos de citocinas nos animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *T. gondii*. Em conclusão, nossos dados sugerem que o aumento da atividade de HO-1 é importante para diminuir a replicação de *T. gondii* no pulmão e no intestino delgado, embora seja necessária a elucidação dos mecanismos envolvidos. Além disso, os mecanismos mediados pela HO-1 durante a infecção por *T. gondii* são diferentes *in vitro* e *in vivo*, uma vez que o aumento da atividade de HO-1 potencializa a multiplicação do parasito *in vitro*.

Palavras-chave: Camundongos BALB/c e C57BL/6, citocinas, heme oxigenase-1, hemina, óxido nítrico, *Toxoplasma gondii*, ZnPPIX

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an apicomplexan parasite characterized to induce type 1 immune response in infected hosts. The parasite has a worldwide distribution and the more severe forms of the disease occur mainly in immunocompromised individuals. Heme oxygenase-1 (HO-1) is the enzyme that catabolizes free heme that induces an intense inflammatory response. Furthermore, the expression of HO-1 is induced by different stimuli, triggering an anti-inflammatory response during biological stress. In order to investigate the role of HO-1 during *T. gondii* infection, RAW 264.7 macrophages were infected with RH strain of *T. gondii* and treated with zinc protoporphyrin IX (ZnPPiX) or hemin, which inhibit or induce HO-1 expression, respectively. To verify the role of HO-1 during *in vivo* infection, BALB/c and C57BL/6 mice were infected with ME49 strain of *T. gondii* and treated with hemin or ZnPPiX during 12 days. The results showed that the inhibition of HO-1 decreased the parasitism in murine RAW 264.7 macrophages and this mechanism seems to be independent of nitric oxide (NO), since ZnPPiX treatment did not alter NO production. In addition, infected RAW 264.7 macrophages stimulated with IFN- γ and treated with hemin presented an increase in NO production; on the other hand, RAW 264.7 cells treated with hemin presented higher parasite replication in comparison with non-treated ones. During *in vivo* infection, we observed that the activity of HO-1 did not alter the inflammatory changes in the organs of *T. gondii* infected BALB/c and C57BL/6 mice. Interestingly, both mice lineages treated with ZnPPiX showed higher parasitism in the lung, whereas treatment with hemin decreased the replication of the parasite in the lung and small intestine of C57BL/6. The levels of IFN- γ , TNF, TGF- β and IL-10 in the sera of infected animals were not altered with the inhibition or induction of HO-1 activity. In conclusion, our data suggest that the increased HO-1 activity is important to decrease *T. gondii* replication in the lung and small intestine, although the mechanisms involved need to be elucidated. Additionally, the mechanisms mediated by HO-1 in *T. gondii* infection are different *in vitro* and *in vivo*, since the increased HO-1 activity enhances the parasite multiplication *in vitro*.

Key words: BALB/c and C57BL/6 mice, cytokines, heme oxygenase-1, nitric oxide, hemin, *Toxoplasma gondii*, ZnPPiX

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, e ordem Coccidia (REY, 2001). A primeira descrição do parasito foi feita em 1908 por Nicole e Manceaux, que encontraram o protozoário nos tecidos do roedor *Ctenodactylus gundi* na Tunísia e por Splendore, no Brasil, que encontrou o parasito em coelhos usados para experimentos laboratoriais (DUBEY, 2008).

T. gondii é capaz de infectar uma série de aves e mamíferos, inclusive humanos, e ainda tem a capacidade de se multiplicar na maioria das células dos hospedeiros (DUBEY, 2004; ELMORE *et al.*, 2010), apresentando uma alta prevalência mundial e importância médica e veterinária (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). No entanto, a infecção pelo parasito é assintomática na maioria dos adultos e crianças, sendo que apenas aproximadamente 10% dos casos apresentam sintomas não-específicos que raramente precisam de tratamento (MONTROYA; LIESENFIELD, 2004; DUBEY; JONES, 2008).

Os parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa apresentam características comuns, como a presença de um complexo apical composto por organelas peculiares, tais como roptrias, micronemas, anel polar e conóide. As micronemas e roptrias são organelas secretoras responsáveis pela mobilidade do parasito, adesão e invasão da célula hospedeira (CARRUTHERS, 1999; MORRISSETE; SIBLEY, 2002).

T. gondii apresenta três estágios infecciosos: taquizoítas (do grego *tachys* = rápido; em grupos ou clones), formas características da fase aguda e responsável pela penetração ativa na célula hospedeira, na qual se multiplicam assexuadamente por divisões binárias; bradizoítas (do grego *brady* = lento, em cistos teciduais), formas que pela pressão imposta pela resposta imune encontram-se dentro de cistos sob replicação lenta na fase crônica da infecção; esporozoítas (contidos dentro dos oocistos liberados nas fezes de felídeos), que corresponde às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY, 2008; JONES; DUBEY, 2010). Os cistos teciduais de *T. gondii* são encontrados em diferentes órgãos, tais como pulmão, fígado e rim, porém, são mais prevalentes nos tecidos muscular e nervoso, incluindo o cérebro, olho, músculos esqueléticos e cardíacos. Esses cistos teciduais podem permanecer latentes no hospedeiro por toda sua vida sem lhe causar danos ou desencadear uma resposta inflamatória (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

As cepas de *T. gondii* isoladas em humanos e outros animais na Europa e América do Norte são classificadas em três linhagens genéticas (tipos I, II e III). Entretanto, existem ainda cepas “recombinantes”, que se assemelham às três principais linhagens genéticas, ou cepas “exóticas”, que apresentam perfil genético diferente das demais (HOWE; SIBLEY, 1995; BOOTHROYD; GRIGG, 2002). As cepas do tipo I (RH, ENT e Martin) são virulentas em camundongos, podendo levar a morte desses animais durante a fase aguda da infecção, enquanto as cepas do tipo II (ME-49, PDS e PLK) e III (CEP e VEG) são raramente fatais durante a fase aguda, mas desencadeiam diversas alterações histológicas nos hospedeiros durante a fase crônica (SUZUKI; COLLIN; REMINGTON, 1989; APPLEFORD; SMITH, 2000). As cepas “exóticas” estão associadas a formas clínicas graves de toxoplasmose ocular em locais como a África e o Brasil (KHAM *et al.*, 2006; AJZENBERG *et al.*, 2009).

1.2. Ciclo de vida

Os felídeos, como os gatos domésticos e selvagens, são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, uma vez que o estágio sexuado do parasito acontece no intestino delgado desses animais (DUBEY; JONES, 2008; SKARIAH *et al.*, 2010).

O estágio sexuado inicia-se quando os hospedeiros intermediários ingerem alguma das três formas infectantes do parasito: taquizoítas, bradizoítas ou esporozoítas. Após a ingestão de cistos teciduais, a parede do cisto é degradada por enzimas proteolíticas no estômago e no intestino delgado. Então, bradizoítas provenientes dos cistos penetram nas células epiteliais do intestino delgado e multiplicam-se assexuadamente por um processo denominado endodiogenia (merogonia), dando origem a merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo. Os merozoítos, então, darão origem aos gametas masculinos e femininos. O gameta feminino é então fecundado pelo masculino e após a fertilização, a formação da parede do oocisto é iniciada em volta do zigoto, ocorre então a liberação dos mesmos no lúmen intestinal através da ruptura das células epiteliais intestinais e eliminação nas fezes dos felídeos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; FERGUSON, 2002; DUBEY, 2004; SKARIAH *et al.*, 2010). Os oocistos não esporulados liberados nas fezes dos felídeos, em condições ideais de temperatura e umidade desenvolvem-se em oocistos esporulados, os quais contem dois esporocistos com quatro esporozoítas cada (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY, 2004).

A fase assexuada do ciclo de *T. gondii* ocorre em ambos os hospedeiros, através da ingestão de cistos teciduais ou água e alimentos contaminados com oocistos esporulados. Após a ingestão de uma das formas infectantes do parasito, este invade as células epiteliais do intestino delgado de seu hospedeiro e se diferencia em taquizoítas. Após uma série de

multiplicações, os taquizoítas disseminam-se para outros tecidos do hospedeiro, completando assim o ciclo assexuado (BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2004; BLACK; SKARIAH *et al.*, 2010).

Além da transmissão pela via fecal-oral, comum aos demais parasitos da ordem Coccidia, *T. gondii* pode ser transmitido pela via transplacentária ou por canivorismo. A infecção por *T. gondii* durante a gestação pode desencadear a infecção do feto ou aborto (DUBEY, 2004). A infecção tardia, ou seja, no terceiro trimestre de gestação, geralmente é menos grave que aquela ocorrida no primeiro trimestre de gestação; sendo que no início da gestação pode ocorrer uma forma grave da doença, podendo levar a morte fetal no útero ou aborto espontâneo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.3. Resposta imune ao parasito

A resposta imune à infecção por *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. Essa variação individual pode ser explicada pelo alto grau de diversidade genética do hospedeiro. Além disso, o parasito é capaz de infectar uma série de tecidos, e a resposta imune é específica em cada um dos sítios de infecção (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

A imunidade celular é considerada o elemento chave da resposta imune do hospedeiro na infecção por *T. gondii*. Fazem parte dessa resposta macrófagos, linfócitos T e células “natural killer” (NK) juntamente com uma série de citocinas. Os anticorpos, apesar de apresentarem um papel secundário na resposta imune ao patógeno, são essenciais para o diagnóstico da toxoplasmose (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

Na fase aguda da infecção por *T. gondii*, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas produzem interleucina (IL)-12, a qual induz a produção de interferon (IFN)- γ por células NK, aumentando assim a atividade microbicida dos macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1994; BLISS; ZHANG; DENKERS, 1999). As atividades antiparasitárias dos macrófagos incluem mecanismos oxidativos e não oxidativos (DING *et al.*, 1988; HUGHES, 1988), bem como a indução da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), enzima responsável pela degradação do triptofano, um aminoácido que é necessário para a replicação de *T. gondii* (PFEFFERKORN *et al.*, 1986). Estudos anteriores mostraram que a ativação de macrófagos por IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF) induzem a produção de altos níveis de intermediários reativos de nitrogênio, que estão envolvidos no controle da replicação do parasito (ADAMS *et al.*, 1990; LANGERMANS *et al.*, 1992). Contudo, mecanismos independentes da enzima óxido nítrico

sintase induzível (iNOS), estão envolvidos na resistência a *T. gondii*, uma vez que camundongos “knockout” para a enzima são resistentes à infecção (SILVA *et al.*, 2002).

O parasito desencadeia uma resposta do tipo Th1, uma vez que macrófagos, células NK, células dendríticas e neutrófilos produzem citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN- γ e IL-12, levando a uma forte resposta mediada por células (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Recentemente, foi verificado a importância do receptor de quimiocina CC 7 (CCR7) para a resistência do hospedeiro a *T. gondii*, uma vez que camundongos “knockout” para o receptor são mais suscetíveis ao parasito, e CCR7 facilita o desencadeamento de uma resposta Th1 e consequente produção de IFN- γ (NOOR *et al.*, 2010). Outro receptor de quimiocinas, CCR2, também está envolvido no recrutamento de células T CD4⁺, macrófagos e células NK para sítios importantes de infecção, como o intestino delgado (BENEVIDES *et al.*, 2008).

Diante da infecção por *T. gondii*, diferentes linhagens de camundongos desenvolvem uma forte resposta Th1, independentemente de seus haplotipos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (GAZZINELLI *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1992). Além disso, o “background” genético dos camundongos parece ser determinante para a resistência ou suscetibilidade ao parasito, uma vez que camundongos C57BL/6 são mais suscetíveis à infecção que camundongos BALB/c (McLEOD *et al.*, 1989a.; McLEOD *et al.*, 1989b; SUZUKI *et al.*, 1995; RESENDE *et al.*, 2008).

Apesar do controle da replicação de *T. gondii* ser dependente da produção de IFN- γ (YAP; SHER, 1999; SILVA *et al.*, 2002), a produção de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para as alterações histológicas da doença (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Sendo assim, a regulação da resposta imune por citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, é importante para o controle de uma resposta Th1 exacerbada (SUZUKI *et al.*, 2000). Recentemente foi observado que a gravidade da encefalite toxoplásmica na fase crônica da doença pode estar relacionada a alta expressão de moléculas de adesão no sistema nervoso central (SNC), tais como ALCAM (molécula de adesão celular de leucócitos ativados) e VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1) (SILVA *et al.*, 2010).

1.4. A heme

A heme é um grupo prostético resultado da combinação de protoporfirina IX e ferro no seu estado ferroso (Fe²⁺) (GUYTON; HALL, 2006). As proteínas que contêm heme, as hemoproteínas, desempenham diversas funções no organismo, tais como transferência de elétrons, peroxidases, catalases, oxidases, óxido nítrico redutases e transporte de oxigênio

(YEUNG; LU, 2008). Esse grupo prostético é produzido tanto pelas mitocôndrias quanto pelos apicoplastos dos parasitos do filo Apicomplexa (NISHI *et al.*, 2008). Quando a heme não está ligada a sua porção protéica, sendo denominada heme livre, o ferro pode ser convertido, de maneira irreversível, de Fe^{2+} para seu estado férrico (Fe^{3+}) (NILSON; COX, 2006).

O efeito citotóxico da heme livre está relacionado com a capacidade do ferro que está contido em seu anel de protoporfirina de atravessar membranas celulares. O ferro age como um potente pró-oxidante, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BALLA *et al.*, 2000). A heme liberada em situações de hemólise ou de hemorragia tem um papel quimiotático, atraindo neutrófilos e estimulando a formação de ROS, amplificando a resposta inflamatória (PORTO *et al.*, 2007). Em condições de homeostase, o efeito pró-oxidante da heme livre é controlado através da inserção da heme em hemeproteínas. Porém, em situações de estresse oxidativo algumas hemeproteínas podem liberar seu grupo heme, que podem catalisar a produção de radicais livres de maneira incontrolável (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). Assim, a quantidade de heme livre deve ser rigorosamente controlada para manter a homeostase celular, evitando condições patológicas (WAGENER *et al.*, 2003).

1.5. Heme-oxigenase: funções e resposta imune

A Heme-oxigenase (HO) é uma enzima que regula o catabolismo da heme, sendo que esse processo leva a formação de pigmentos de biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono (CO). A biliverdina é então convertida em bilirrubina pela biliverdina redutase enquanto a presença de ferro livre induz a expressão de ferritina, uma proteína responsável pelo armazenamento de ferro (TENHUNEN *et al.*, 1969; SOARES; BACH, 2009). HO está presente em várias formas de vida, como bactérias, fungos, plantas e mamíferos, protegendo as células de um estresse oxidativo induzido pela heme (CICCARELLI *et al.*, 2006). Atualmente, sabe-se que existem três isoformas (HO-1, HO-2 e HO-3) da enzima que catalisam a reação de degradação da heme. A expressão de HO varia de acordo com os diferentes tecidos, sendo mais significativa nos tecidos envolvidos com o metabolismo de eritrócitos ou hemoglobina, como o baço, fígado e medula óssea (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Em condições fisiológicas normais, a maioria das células expressa níveis baixos ou indetectáveis de HO-1, enquanto HO-2 é constitutivamente expressa principalmente no cérebro e nos testículos (OTTERBEIN; CHOI, 2000; WAGENER *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2008). A caracterização da isoforma HO-3 ainda não é bem elucidada, e estudos

anteriores têm demonstrado que, em ratos, os genes para HO-3 não são funcionais (HAYASHI *et al.*, 2004).

A principal função da HO-1 é evitar o acúmulo de heme livre (TENHUNEN *et al.*, 1969). Contudo, a enzima é induzida por diversos estímulos, como óxido nítrico, citocinas e fatores de crescimento, metaloporfirinas, peróxido de hidrogênio e metabólitos lipídicos (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Apesar da função da HO-1 não ser completamente elucidada, estudos anteriores sugerem que a indução endógena de HO-1 promove efeitos citoprotetores (SOARES *et al.*, 2009; GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010), anti-inflamatórios (OTTERBEIN *et al.*, 2000; KAPTURCZAK *et al.*, 2004) e anti-apoptóticos (ZUCKERBRAUN *et al.*, 2003).

O papel da HO-1 é importante em uma série de processos inflamatórios. Em um modelo experimental de sepse, observou-se que a indução de HO-1 através de indutores farmacológicos ou através da transfecção de genes da enzima aumenta a sobrevivência dos camundongos tratados (TSOYI *et al.*, 2009). Estudos recentes mostraram que a indução da HO-1 durante a inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminui o número de infiltrados inflamatórios e a eosinofilia no pulmão de camundongos BALB/c (LEE *et al.*, 2010). O papel protetor da HO-1 durante doença pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos (LPS) em camundongos da mesma linhagem está relacionado também com a modulação negativa da expressão do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) no tecido pulmonar (YIN *et al.*, 2010). A enzima parece ser importante também em doenças hepato-renais, uma vez que sua inibição nos rins de animais experimentais agrava a patogenia da doença (GUO *et al.*, 2011). Além disso, a HO-1 participa na modulação da resposta imune diante de organismos infecciosos, como vírus da hepatite C (ZHU *et al.*, 2008).

Estudos anteriores demonstraram que HO-1 possui um papel importante durante infecções parasitárias. Animais BALB/c infectados com *Plasmodium berghei* são resistentes a malária cerebral experimental (ECM) e apresentam altos níveis de HO-1 comparados aos animais C57BL/6, que são suscetíveis ao parasito. Quando camundongos BALB/c são tratados com um inibidor da HO, protoporfirina de zinco IX (ZnPPIX), apresentam altos índices de inflamação do sistema nervoso e rompimento da barreira hematocefálica, provocado pela ação de ROS às junções oclusivas que mantém a integridade da barreira. Contrariamente, o tratamento dos animais C57BL/6 com um indutor da HO-1, protoporfirina de cobalto IX (CoPPIX), contribuiu para o aumento da sobrevivência desses animais e diminuição da incidência de ECM (PAMPLONA *et al.*, 2007). Em contraste ao seu papel benéfico para o

hospedeiro durante a fase cerebral, na fase hepática da infecção, os esporozoítos induzem a expressão de HO-1 pelos hepatócitos, macrófagos e leucócitos do fígado. Essa expressão promove uma proteção contra a resposta imunológica do hospedeiro e permite o desenvolvimento do parasito nessa fase da infecção (EPIPHANIO *et al.*, 2008). Ainda nas formas não cerebrais da malária, o efeito citotóxico da heme no fígado é revertido pela expressão de HO-1. Como consequência, há uma diminuição dos danos hepáticos causados durante a infecção, independente da carga parasitária. A expressão de HO-1 nos hepatócitos também é importante para controlar a apoptose mediada por TNF nessas células (SEIXAS, *et al.*, 2009).

Outro trabalho mostrou que a infecção de macrófagos com amastigotas de *Leishmania pifanoi*, resulta em um aumento da expressão de HO-1, como um possível mecanismo de evasão do parasito. Esse aumento desencadeia uma baixa expressão de superóxidos importantes na eliminação do parasito. Quando a atividade de HO-1 é reduzida pela adição de inibidores, é observado um aumento da produção de superóxidos, enquanto que na presença de indutores de HO-1, a produção de superóxidos é reduzida (PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005).

A deficiência em HO-1 está associada a uma ativação exacerbada de macrófagos e células T, levando a um desenvolvimento de um perfil predominantemente pró-inflamatório. Quando células de baço de animais “knockout” para HO-1 (HO-1^{-/-}) são estimulados com LPS eles apresentam uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF em relação aos animais HO-1^{+/+} (KAPTURCZAK *et al.*, 2004). A indução da HO-1 resulta na inibição de uma série de mecanismos efetores da resposta imune. A citotoxicidade mediada por células T e células NK é significativamente reduzida quando a atividade da enzima é aumentada (WOO *et al.*, 1998).

Recentemente foi observado que a inibição de HO-1 induz a ativação, proliferação e maturação de células T “naive” CD4⁺ e CD8⁺, sugerindo um papel importante da enzima no controle da proliferação dessas células (BURT *et al.*, 2010). De forma similar, outros estudos demonstraram que a indução de HO-1 em células T CD4⁺ ativadas diminui a proliferação das mesmas (BIBURGER *et al.*, 2010). A HO-1 também é importante para o funcionamento das células T reguladoras (Tregs), porém, a sua capacidade supressora não é dependente da expressão própria da enzima (ZELENAY *et al.*, 2007; GEORGE *et al.*, 2008). Entretanto, a atividade das Tregs está relacionada com a HO-1 presente nas células apresentadoras de antígeno, uma vez que estudos anteriores demonstraram que células Tregs co-cultivadas com

células dendríticas provenientes de animais HO-1^{-/-} possuem sua atividade supressora diminuída (GEORGE *et al.*, 2008).

No entanto, a HO-1 parece ter um efeito duplo durante processos inflamatórios. Estudos prévios mostraram que a bilirrubina, proveniente da ação catalítica de HO-1, pode levar a apoptose de neurônios (GROJEAN *et al.*, 2000). A alta expressão de HO-1 também contribui para os danos patológicos causados por doenças degenerativas do sistema nervoso (SCHIPPER, 2000). Por outro lado, um aumento na atividade de HO-1 pode ser considerado citoprotetor por remover a heme livre, a qual possui alta afinidade por constituintes celulares como proteínas, lipídeos e cromatina, sendo que o ferro livre pode causar a formação de ROS, desencadeando efeitos maléficos para a célula (MAINES; GIBBS, 2005). Assim, a HO-1 pode modular a resposta imunológica de maneiras divergentes, sendo que sua ação benéfica ou prejudicial parece ser dependente do contexto no qual a enzima é induzida (DONG *et al.*, 2000; MAINES; GIBBS, 2005).

1.6. Mecanismos de ação dos produtos finais da atividade de HO-1

Os produtos catalíticos da via da HO-1 também apresentam efeitos protetores. Em condições fisiológicas, CO é uma molécula reguladora essencial para o controle de reações inflamatórias e pode conter o efeito deletério de uma série de condições inflamatórias experimentais (SOARES; BACH, 2009). Células expostas ao CO liberam em poucos minutos uma pequena quantidade de ROS produzidos pela mitocôndria, os quais podem ativar diferentes vias de sinalização, como a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) p38, que pode ser crítica para o efeito citoprotetor de HO-1 e de CO (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). Estudos anteriores mostraram que CO é capaz de conferir proteção a danos hepáticos em camundongos e diminuir a apoptose mediada por TNF em hepatócitos. Esse efeito protetor está diretamente ligado à ativação da HO-1 através da produção de óxido nítrico (NO) (ZUCKERBRAUN *et al.*, 2003). Em contraste, outros estudos demonstraram que os efeitos mediados pela ação de CO são independentes da produção de NO. Em condições experimentais, CO é capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 β e proteína-1 α inflamatória de macrófago (MIP-1 α) *in vitro* e *in vivo* e induzir a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (OTTERBEIN *et al.*, 2000). Além disso, a inalação de baixas doses de CO é capaz de modular a resposta imune durante inflamação induzida nas vias aéreas de camundongos (AMEREDES *et al.* 2003). Com relação a infecções parasitárias, a administração de CO durante a infecção por *P. berghei* também foi capaz de atenuar as alterações histológicas no cérebro de animais infectados (PAMPLONA *et*

al., 2007), porém levou a um aumento do parasitismo no fígado de camundongos infectados (EPIPHANIO *et al.*, 2008).

Tanto a biliverdina quanto a bilirrubina podem apresentar papéis protetores em situações de estresse biológico. Assim, estudos anteriores mostraram que ambas tem papel importante na proteção de células epiteliais diante da estimulação por LPS (JANSEN *et al.*, 2010). Outros trabalhos também demonstraram que o tratamento de camundongos com biliverdina, um metabólito da via de HO-1, possui papel protetor através da diminuição de infiltrados de células T CD4⁺ e T CD8⁺, induzindo tolerância a transplantes cardíacos em camundongos (YAMASHITA *et al.*, 2005). A biliverdina também apresentou papel protetor em doenças inflamatórias no pulmão, uma vez que camundongos que receberam esse produto final da via da HO-1 mostraram-se mais resistentes e apresentaram níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, o tratamento é capaz de diminuir inflamação no pulmão desses camundongos (KESHAVAN *et al.*, 2005; SARADY-ANDREWS *et al.*, 2005). A administração de bilirrubina também confere tolerância a transplantes em camundongos, visto que o tratamento aumenta a sobrevivência dos mesmos e diminui a expressão de fatores pró-inflamatórios como TNF e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (WANG *et al.*, 2005).

A degradação da heme pela HO-1 resulta na produção de ferro livre, que é potencialmente prejudicial, pois ele está associado à geração de radicais livres. No entanto, o átomo de ferro instável produzido regula positivamente a expressão da ferritina, que se liga e armazena o íon ferro e possui propriedades citoprotetoras (SOARES; BACH, 2009; GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010), como o efeito antiapoptótico durante o processo de morte celular induzida por TNF em células HeLa (COZZI *et al.*, 2003). De forma similar, a ferritina inibe a citólise mediada por processos oxidativos em células endoteliais (BALLA *et al.*, 1992).

Devido ao efeito anti-inflamatório de HO-1, decidimos avaliar o papel da enzima na infecção por *T. gondii* em duas linhagens de camundongos, uma que desenvolve alterações inflamatórias graves durante a infecção, C57BL/6, e são mais suscetíveis, e outra que desenvolvem alterações inflamatórias menos graves e são mais resistentes, BALB/c. Além disso, como o efeito da HO-1 em infecção por *T. gondii* ainda não foi avaliado, decidimos verificar o seu papel direto no controle do parasito em linhagens celulares que são capazes de conter a replicação do parasito quando estimuladas com IFN- γ .

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose, doença causada pelo protozoário *T. gondii*, é uma doença de prevalência mundial e acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. Além disso, a toxoplasmose congênita e a encefalite toxoplásmica são as formas mais graves da doença. Os mecanismos de resposta imunológica a *T. gondii* não são totalmente elucidados, embora seja sabido que o parasito induz uma resposta do tipo Th1 em seus hospedeiros, independentemente de seu “background” genético.

Sabe-se que a enzima HO-1 tem um papel importante na resposta imunológica em diferentes situações de estresse biológico. A enzima participa na resposta imune diante de protozoários como *Plasmodium* e *Leishmania*.

Considerando que os mecanismos da resposta imune à *T. gondii* ainda não são bem elucidados e que a enzima HO-1 participa na modulação da imunidade frente a outros protozoários, novos dados podem ser adicionados no entendimento da resposta imune ao parasito, através da elucidação da participação de HO-1 na toxoplasmose experimental.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi verificar o papel da HO-1 durante a infecção *in vitro* e *in vivo* por *T. gondii*.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar o efeito do bloqueio ou indução de HO-1 na replicação de *T. gondii* em macrófagos infectados;
- Verificar se a HO-1 está relacionada à produção de óxido nítrico durante a infecção por *T. gondii*;
- Avaliar as alterações histológicas ocorridas durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* quando a atividade de HO-1 está bloqueada ou induzida em camundongos BALB/c e C57BL/6;
- Quantificar o parasitismo tecidual nos órgãos de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com o inibidor ou indutor da atividade de HO-1 e infectados com *T. gondii*;

- Verificar o perfil de citocinas de animais tratados com o inibidor ou indutor da atividade de HO-1 e infectados com *T. gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Organismos infecciosos

4.1.1. Manutenção *in vitro* da cepa RH de *T. gondii*

Os parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram utilizados nos experimentos *in vitro*. A manutenção do parasito foi feita através de passagens seriadas em células de linhagem trofoblástica (BeWo). Para isso, o sobrenadante de cultura de células BeWo infectadas com a cepa RH de *T. gondii* nas quais as células se encontravam lisadas pelos parasitos, foi transferido para um tubo de 15 ml e centrifugado por cinco minutos a 1500 rpm à temperatura ambiente para remoção de restos celulares. O sobrenadante contendo taquizoítas foi ressuspenso em 0,5 ml de meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; Cultilab, Campinas – SP, Brasil) e inoculados em novas garrafas contendo células da linhagem BeWo.

Os taquizoítas provenientes das células BeWo foram utilizados para infecção de linhagem de macrófagos RAW 264.7, os quais foram adquiridos de ATCC (Manassas – VA, USA). Esta linhagem foi estabelecida a partir da infecção pelo vírus Abelson da leucemia murina. Para infecção dos macrófagos, o sobrenadante das células BeWo contendo taquizoítas foi ressuspenso em 0,5 ml de meio de cultura e centrifugado por um minuto a 500 rpm. Posteriormente, o sobrenadante contendo taquizoítas livres foi transferido para um tubo de 15 ml, centrifugado a 1500 rpm por cinco minutos em temperatura ambiente e o “pellet” foi ressuspenso em 1 ml de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Cultilab, Campinas – SP, Brasil) para serem utilizados na infecção das células RAW 264.7.

4.1.2. Manutenção *in vivo* da cepa ME49 de *T. gondii*

A cepa ME49 de *T. gondii* foi mantida em camundongos Swiss, os quais foram inoculados por via intraperitoneal com 20 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, o cérebro foi removido, lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, estéril, pH 7.2 e homogeneizado com uma seringa e agulha de calibre 25 x 7. O homogeneizado cerebral foi novamente lavado por centrifugações a 2000 rpm por 10 minutos em PBS. Os

cistos cerebrais foram contados em microscópio de luz utilizando uma objetiva de 10 x de aumento e utilizados para a infecção dos animais (BARBOSA et al., 2007).

4.2. Cultura de células RAW 264.7

A linhagem de macrófagos de camundongos RAW 264.7 foi cultivada em garrafas de 25 cm² contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) e 1% de antibióticos (10.000U/ml de penicilina, e 100mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chem Co., St. Louis – MO, EUA). As células foram mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de dióxido de carbono (CO₂).

O repique de células foi realizado a cada três dias e procedeu-se, brevemente, da seguinte maneira: novo meio de cultura foi adicionado a garrafa de cultivo e com a ajuda de “cell scrapers” as células foram retiradas e transferidas para tubo de 15 ml e centrifugadas, a temperatura ambiente, por 5 minutos a 1500 rpm. O “pellet” foi então ressuspensão em 1 ml de meio de cultura contendo soro e distribuído em duas novas garrafas de cultivo celular. O excedente foi congelado em meio de congelamento (90% de meio de cultura a 10% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido – DMSO).

4.3. Obtenção de IFN- γ no sobrenadante de células L1210

A linhagem celular L1210 de células tumorais de leucemia linfoblástica de murinos foi mantida em meio RPMI 1640. A cada três dias, o repique de células foi realizado e o sobrenadante coletado e acondicionado em freezer -80°C até o momento do uso.

Para a determinação da concentração de IFN- γ contida no sobrenadante, foi realizado um Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA). As concentrações da citocina nas amostras de sobrenadante foram calculadas a partir de uma curva padrão da citocina murina recombinante. A concentração de IFN- γ encontrada no sobrenadante das células L1210 foi de 13ng/ml.

4.4. Análise da viabilidade de células RAW 264.7 tratadas com ZnPPiX ou hemina

Para a análise da viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 após o tratamento com ZnPPiX ou hemina, as células foram tratadas separadamente por 24 ou 48 horas com ambos os fármacos e coradas com azul de tripan. Em um total de 100 células analisadas, foi

verificado o número de células viáveis (não coradas por azul de tripan) e o número de células não viáveis (coradas pelo azul de tripan). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

4.5. Análise do efeito de ZnPPiX ou hemina na produção de NO por macrófagos RAW 264.7

Para análise da produção de NO e citocinas, células RAW 264.7 foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm e ressuspensas em 1 ml de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino. Posteriormente foram contadas em câmara de Neubauer e as células não viáveis excluídas pela coloração com azul de tripan. Após o ajuste para a concentração de 3×10^4 células viáveis por poço (200 μ l), as células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Para a infecção das células, a cepa RH de *T. gondii* foi utilizada na proporção de 3 parasitos por célula, sendo que, após 5 horas de infecção, o meio contendo parasitos livres foi removido e um novo meio adicionado.

Os experimentos foram realizados em duas diferentes condições: 24 ou 48 horas de tratamento. As células RAW 264.7 foram tratadas 24 horas antes e 24 horas após a infecção por *T. gondii* (condição 48 horas de tratamento) ou apenas tratadas por 24 horas após a infecção com o parasito (condição de 24 horas de tratamento). Quando na ausência de parasito, os macrófagos RAW 264.7 foram tratados por 24 ou 48 horas ininterruptamente.

Os tratamentos utilizados foram ZnPPiX (Sigma Chem Co., St. Louis – MO, EUA) (10 μ M), hemina (Sigma Chem Co., St. Louis – MO, EUA) (10 μ M), IFN- γ (1,5ng/ml) e/ou LPS (*Escherichia coli* sorotipo 0111:B4; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) (1 μ g/ml). Tanto ZnPPiX quanto hemina foram diluídos em uma solução de DMSO 10% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M (pH 13,0). Em ambas as condições de tratamento, células incubadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

4.6. Análise do efeito de ZnPPiX, hemina ou IFN- γ na proliferação do parasito em macrófagos RAW 264.7

Para verificar o efeito de ZnPPiX ou hemina na proliferação do parasito, as células RAW 264.7 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm em placas de cultura de 24 poços em uma concentração de 3×10^4 células viáveis por lamínula (200 μ l).

As células foram tratadas com ZnPPiX, hemina ou IFN- γ nas condições 24 ou 48 horas de tratamento como descrito no item 4.5. Macrófagos infectados e não tratados foram utilizados como controle.

Após o tempo determinado de cada condição, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol gelado por 30 minutos e coradas com Giemsa. As lamínulas foram analisadas em microscópio óptico e os resultados expressos como taxa da infecção da seguinte maneira: (a) porcentagem de células infectadas por 200 células examinadas; (b) média do número total de parasitos em 200 células examinadas, denominado como proliferação de *T. gondii*. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

4.7. Determinação dos níveis de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 tratadas com ZnPPiX, hemina, LPS ou IFN- γ e infectadas ou não com *T. gondii*

A concentração de nitrito em sobrenadantes de células RAW 264.7 foi mensurada pelo método de Griess (GREEN *et al.*, 1982) como um indicativo da produção de NO. Brevemente, 50 μ l de sobrenadante de cultura foram homogeneizados com reagente de Griess [sulfanilamina 1% e diidrocloreto de naftaleno (NEED) 0,1% na proporção 1:1] por 10 minutos e a absorbância foi determinada em 590 nm. Foi utilizado meio de cultura como branco e os níveis de nitrito em cada amostra foram calculados a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂).

4.8. Animais experimentais

O presente estudo utilizou camundongos de 8-12 semanas de idade, das linhagens BALB/c e C57BL/6, sendo que cada grupo de cada linhagem continha no mínimo 6 animais. Os animais foram adquiridos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada. O experimento foi aprovado Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o protocolo de número 007/09 (ANEXO I).

4.9. Inibição ou indução da atividade de HO-1 em camundongos BALB/c e C57BL/6

Para inibição ou indução da atividade de HO-1, ZnPPiX ou hemina, respectivamente, foram diluídos em solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 50 mM (pH 9,0) e o volume final ajustado com o mesmo volume de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%. Os camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com ZnPPiX (10mg/kg/dia), hemina (5mg/kg/dia) ou apenas com o veículo (Na_2CO_3 + NaCl; grupo controle) subcutaneamente. Os tratamentos iniciaram-se 1 dia antes da infecção por *T. gondii* e prosseguiram até o 11º dia de infecção.

4.10. Infecção experimental, avaliação dos parâmetros clínicos e coleta do material

Após 1 dia de tratamento, os camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* diluídos em 0,2ml de PBS e os animais foram tratados por mais 11 dias com ZnPPiX, hemina ou veículo. Os animais foram observados diariamente quanto à mortalidade, morbidade e alterações de peso individual durante 12 dias após a infecção. A avaliação da morbidade foi estabelecida utilizando um sistema baseado em escores como previamente descrito (BARTLEY *et al.*, 2006), de acordo com os seguintes critérios: (0) pelo brilhante, animal ativo; (1) pelo ouriçado, animal ainda ativo; (2) pelo arrepiado, animal pouco ativo; (3) pelo muito arrepiado, diminuição na frequência de locomoção do animal; (4) pelo muito arrepiado, pouca movimentação do animal.

No dia 12 após a infecção, grupos de pelo menos seis animais foram anestesiados intraperitonealmente com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, Cotia – SP, Brasil)/Xilazina (Schering-Plough Coopers, Cotia – SP, Brazil) e o sangue foi coletado por punção do plexo retro orbital. Os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos periféricos (pulmão, coração, fígado, baço, intestino delgado) e o SNC, foram coletados. O intestino delgado foi coletado em toda a sua extensão e segmentado em quatro porções: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Essas foram lavadas com PBS e enroladas, cuidadosamente, em finos palitos de madeira formando um “rolo suíço”. Os órgãos foram então fixados em formol tamponado 10% e incluídos em parafina.

Para obtenção do soro, após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado durante 5 minutos a 2000 rpm, o soro foi coletado e preservado à -80 °C até o momento do uso.

4.11. Coloração pela Hematoxilina-eosina (HE) para determinação das alterações histológicas nos tecidos

Os cortes teciduais foram desparafinados em xilol durante 30 minutos, re-hidratados em alcoóis de concentrações decrescentes, 100, 95, 85 e 70% durante 10 segundos cada. As lâminas contendo os cortes foram colocadas em água corrente durante 15 minutos e embebidas em Hematoxilina de Harris durante 30 segundos. Os cortes permaneceram por mais 15 minutos em água corrente e foram imersos em Eosina-Floxina por 2 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente rapidamente e desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes (70, 85, 95, 100%) durante 10 segundos cada e mantidas em xilol por 10 minutos. As lâminas foram montadas em lamínulas e Entelan.

4.12. Imunohistoquímica para detecção de parasitos

O parasitismo tecidual foi avaliado no pulmão, fígado e intestino delgado por imunohistoquímica como previamente descrito (SILVA *et al.*, 2010). Resumidamente, os cortes, desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6,0, em forno microondas durante 5 minutos e os sítios não específicos foram bloqueados pela incubação dos cortes com leite desnatado 3% por 30 minutos (Molico; Nestlé Brasil Ltda., São Paulo – SP, Brasil). Feito isso, os cortes foram incubados durante a noite toda, com soro de *Calomys callosus* anti-*T. gondii* (produzido em nosso laboratório através da infecção de *C. callosus* com a cepa ME49 de *T. gondii*) diluído em saponina 0,01%. O anticorpo secundário utilizado foi imunoglobulina G (IgG) de cabra biotinizada anti-camundongo (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA). A reação foi amplificada usando o complexo avidina biotina peroxidase (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) e desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz. O parasitismo tecidual foi avaliado contando-se o número de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cistos presentes em 50 campos microscópicos no pulmão, nas quatro porções do intestino delgado e por secção tecidual no fígado. As análises foram feitas utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em 2 secções teciduais por animal e no mínimo utilizando-se 6 animais por grupo experimental.

4.13. Análises histológicas

Nas análises histológicas, foi avaliada a infiltração de leucócitos no pulmão, intestino delgado, fígado e cérebro. O escore inflamatório foi realizado como previamente descrito por Silva e colaboradores (2009). Os infiltrados inflamatórios no pulmão foram graduados de

acordo com a infiltração celular nos septos alveolares em 40 campos microscópicos do tecido pulmonar. No fígado, focos inflamatórios foram quantificados, assim como áreas necróticas no parênquima, quando presentes. No intestino, as lesões inflamatórias foram graduadas de acordo com a presença e extensão de infiltrados inflamatórios na lâmina própria e submucosa, alargamento das vilosidades e aumento em sua espessura, assim como presença de necrose. Para obter o escore do infiltrado inflamatório no SNC, o número total de focos inflamatórios focais ou difusos foi quantificado em seções sagitais e na bainha dos vasos sanguíneos (manguito perivascular), bem como a infiltração de células inflamatórias nas meninges, que também foi analisada. Os escores inflamatórios nos órgão periféricos e SNC foram representados como unidades arbitrárias como sendo: 0 – 2, suave; 2 – 4, moderado; 4 – 6, grave; e acima de 6, muito grave. Todas as análises foram feitas em 2 cortes histológicos por animal, em pelo menos 5 animais por grupo, com a objetiva de 40 x de aumento, em ensaio duplo cego. As alterações histológicas e o parasitismo tecidual foram concordantes entre os indivíduos de um mesmo grupo e entre os cortes dos mesmos órgãos para cada camundongo.

4.14. Determinação dos níveis de bilirrubina no soro de animais tratados

Sabendo que a bilirrubina é um produto secundário da atividade da enzima HO-1, os níveis de bilirrubina foram então determinados a partir do soro de animais infectados com *T. gondii* e tratados com ZnPPiX, hemina ou veículo, além de amostras advindas de animais controles não tratados e não infectados. A dosagem foi realizada com o uso de um kit analítico (Labtest, Lagoa Santa –MG, Brasil). A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 520 nm e os resultados foram expressos em mg/dl.

4.15. Detecção de IFN- γ , IL-10, IL-12p70, TNF e TGF- β nas amostras de soro de animais infectados

A detecção de citocinas foi realizada pelo teste ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante como se segue: IFN- γ , IL-12p70 e fator transformador de crescimento (TGF)- β (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) e TNF e IL-10 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). As concentrações das citocinas nas amostras de soro foram calculadas a partir de uma curva padrão de citocinas murinas recombinantes. O limite de detecção para cada ensaio foi de 39 pg/ml (IL-12p70), 31,3 pg/ml (IFN- γ e IL-10), 15,6 (TNF) e 15,6 pg/ml (TGF- β). Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio ficaram abaixo de 20% e 10%, respectivamente.

4.16. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos experimentais para todos os experimentos, exceto os resultados de dosagem de citocinas no sobrenadante dos soros, os quais foram expressos em mediana. A comparação de dados entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c foi analisada pelo teste *t* de Student, enquanto que a comparação entre as diferentes condições experimentais foi analisada pelo teste ANOVA (“one-way”) e pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. A comparação das diferenças das citocinas entre as linhagens foi realizada pelo teste de Mann Whitney e as diferenças entre as condições experimentais de cada linhagem foram analisadas pelo teste de Kruskal Wallis. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidade celular de células RAW 264.7 tratadas com ZnPPiX ou hemina

Para verificar se o inibidor da HO-1 (ZnPPiX) e o indutor da enzima (hemina) não alteram a viabilidade celular, macrófagos RAW 264.7 foram tratados por 24 ou 48 horas e coradas com azul de tripan.

As células incubadas durante 24 horas apenas com o meio ou com ZnPPiX ou hemina apresentaram em média, 70 a 75% de viabilidade. Os resultados obtidos mostraram que a porcentagem de células viáveis para ambos os tratamentos não foi estatisticamente diferente quando comparada às células não tratadas (controle) (Figura 1A). Entretanto, quando as células foram tratadas durante 48h observou-se uma queda na viabilidade celular para 60% (Figura 1B). Embora o número de células viáveis tenha sido menor para a condição de 48 horas, foi observado que a morfologia das células não foi alterada devido aos tratamentos recebidos ou mesmo na condição controle (Figura 2). Provavelmente a queda na viabilidade das células seja devido a menor viabilidade das mesmas quando cultivadas por um tempo prolongado.

O teste de viabilidade celular foi também realizado pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) conforme descrito por Mosmann (1983). Este método colorimétrico consiste na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial nas células vivas reduzirem o sal MTT no produto colorido denominado formazana. Contudo, de

acordo com os resultados obtidos do ensaio de MTT, as células tratadas com ZnPPiX apresentavam viabilidade celular inferior a 40%. Quando as células eram observadas ao microscópio invertido, foi possível verificar que a morfologia das células não era alterada diante do tratamento com ZnPPiX. Uma vez que ZnPPiX atua como um inibidor da HO-1 por mecanismos de competição com a heme, pode ser que essa protoporfirina alterou a funcionalidade de hemeproteínas presentes na mitocôndria, tais como o citocromo c, influenciando na redução do MTT ocorrida nessa organela.

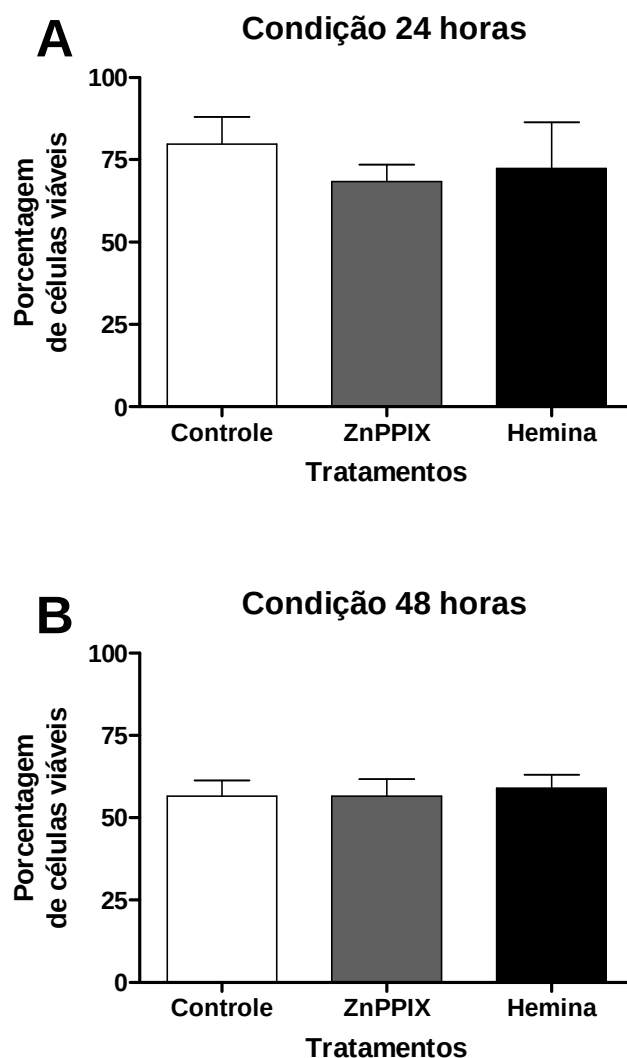


Figura 1. Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 não infectados e tratados por 24 (A) ou 48 horas (B) com ZnPPiX (10 μ M), hemina (10 μ M) ou apenas meio de cultura (controle). As células foram coradas por azul de tripan e posteriormente analisadas em microscópio óptico. As células coradas em azul foram consideradas invíáveis. Os dados são representativos de um experimento realizado em quintuplicata.

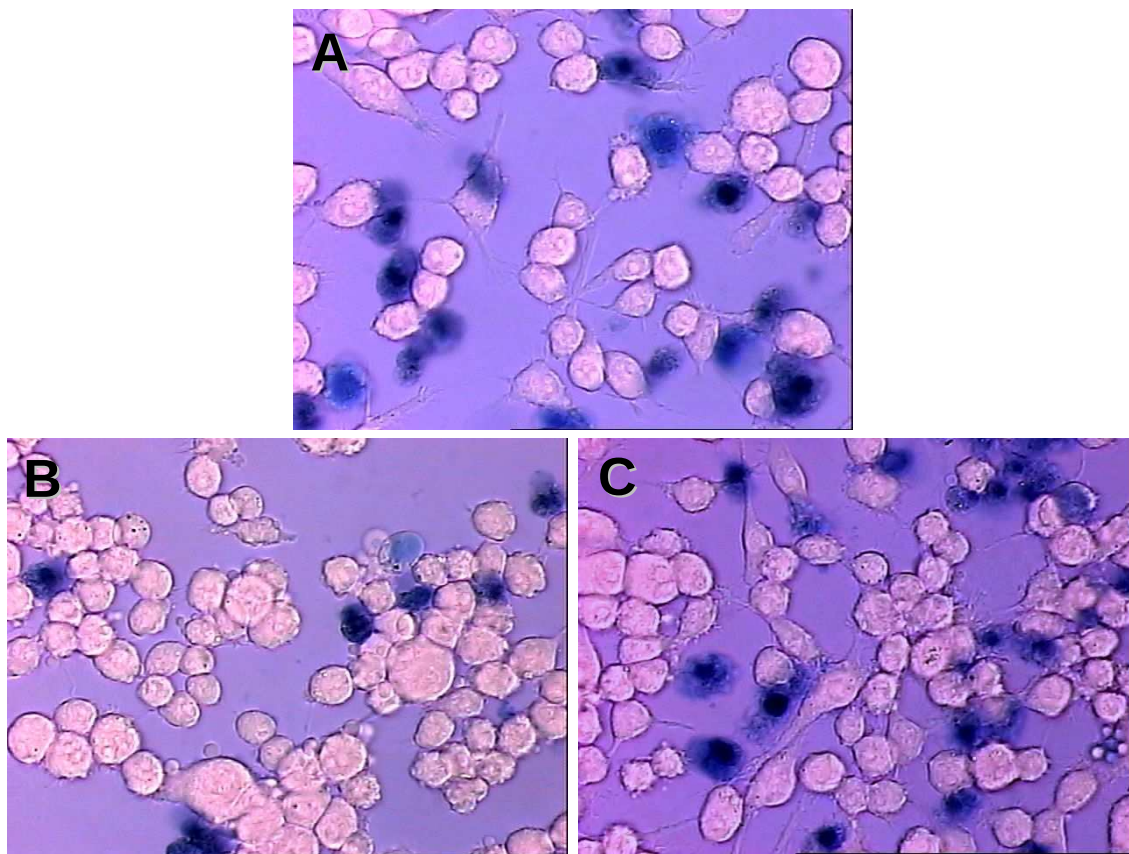


Figura 2. Fotomicrografia representativa da morfologia das células incubadas apenas com meio de cultura (A), ZnPPiX (10 µM) (B) ou hemina (10 µM) (C) por 48 horas. Após 48 horas de tratamento as células foram coradas por azul de tripan. Imagem utilizando a objetiva de 40 x de aumento.

5.2. Taxas de infecção de células RAW 264.7 infectadas com *T. gondii* e tratadas com ZnPPiX ou hemina

Para a determinação das taxas de infecção das células RAW 264.7, as mesmas foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13 mm, tratadas por 24 ou 48 horas com IFN- γ , ZnPPiX ou hemina e infectadas com parasitos da cepa RH de *T. gondii*. Foram analisadas 200 células por lamínula e os resultados expressos em número total de parasitos quantificados ou porcentagem de células infectadas.

Quando tratados com IFN- γ por 24 ou 48 horas, o parasitismo total foi diminuído nos macrófagos quando comparado às demais condições de tratamento (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3A, 3B), bem como a porcentagem de células infectadas (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3C, 3D).

De forma semelhante, os macrófagos tratados com ZnPPiX por 24 horas apresentaram significativa redução do parasitismo em comparação aos macrófagos infectados e não tratados (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3A). Embora não se observou diferença estatisticamente significativa, células tratadas com ZnPPiX durante 48 horas apresentaram uma tendência na diminuição do parasitismo (Figura 3B). A inibição da atividade de HO-1

também diminuiu a porcentagem de células infectadas tanto na condição 24 horas de tratamento (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3C) quanto na condição 48 h de tratamento (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3D). Entretanto, o efeito de IFN- γ mostrou-se mais potente no controle do parasito intracelular quando comparado com a diminuição da atividade da HO-1 (Figura 3).

Quando as células foram tratadas com hemina por 48 horas, houve um expressivo aumento do parasitismo total (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3B). Embora esse fenômeno não tenha sido observado na condição 24 horas, as células tratadas com hemina apresentaram maior parasitismo do que aquelas tratadas com ZnPPiX em ambas as condições (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3A, 3B). Fato interessante foi que a indução da atividade da enzima através do tratamento com hemina por 24 horas diminuiu a porcentagem de células infectadas em comparação às células infectadas e não estimuladas (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 3C) e, na condição 48 horas esse índice não foi alterado (Figura 3D). Sendo assim, os resultados mostram que a inibição da atividade da HO-1 é capaz de diminuir o parasitismo de macrófagos infectados com a cepa RH de *T. gondii*, e que indução da enzima favorece a multiplicação do parasito.

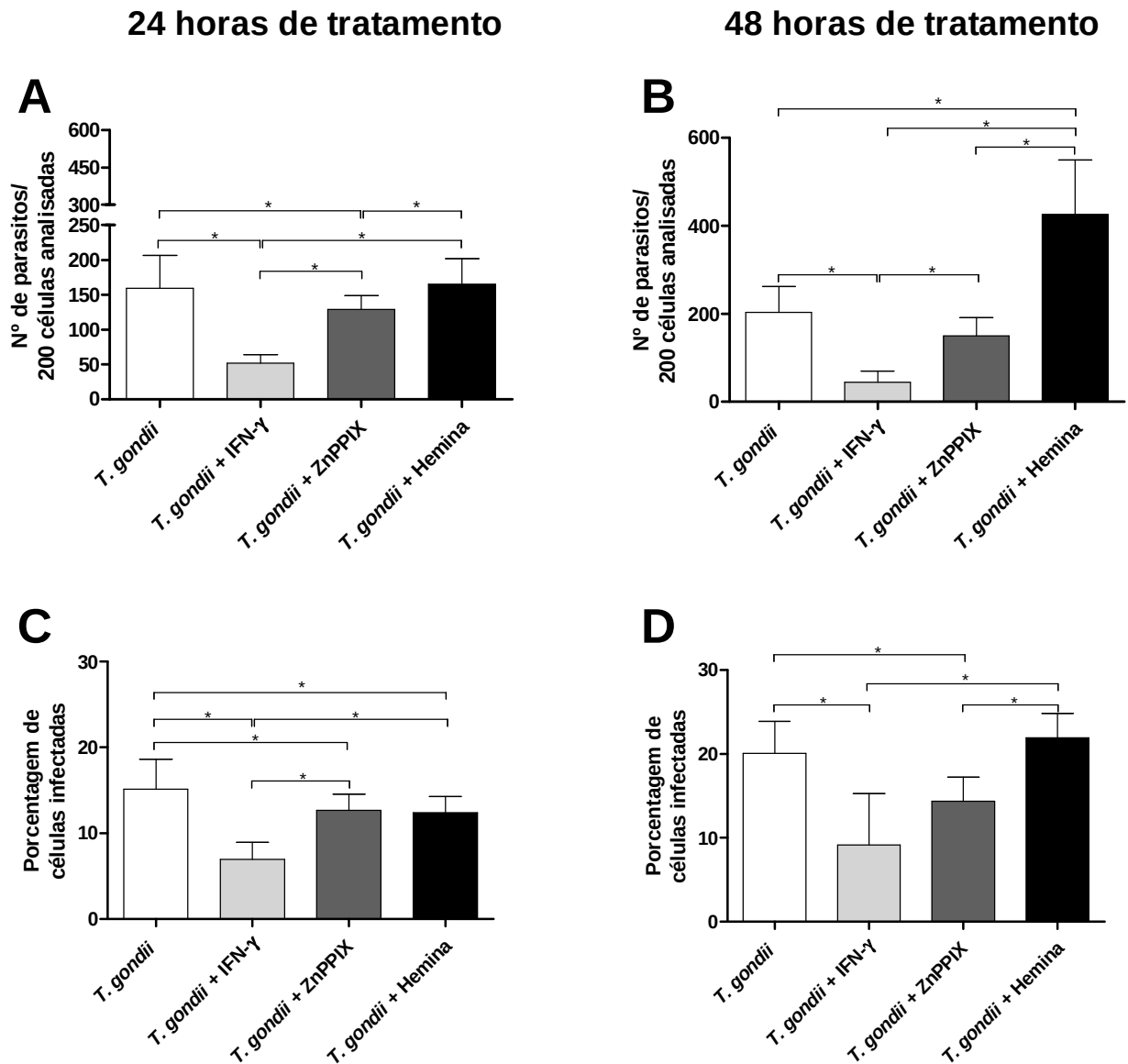


Figura 3. Efeitos dos tratamentos com IFN- γ (1,5 ng/ml), ZnPPiX (10 μ M) ou hemina (10 μ M) na proliferação total (A,B) e na porcentagem de macrófagos RAW 264.7 infectados (C, D) por *T. gondii* após 24 (A, C) ou 48 horas (B, D) de tratamento. O índice de proliferação total corresponde ao número de parasitos em 200 células analisadas. Para a porcentagem de células infectadas foram analisadas 200 células. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. *Diferenças estatísticas significantes entre as diferentes condições (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p < 0,05$).

5.3. A indução da atividade da HO-1 potencializa a produção de NO em macrófagos murinos RAW 264.7 mesmo na presença de *T. gondii*

Como um indicativo da produção de NO, os níveis de nitrito foram mensurados no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 infectados com *T. gondii* submetidos ou não ao tratamento com LPS, IFN- γ , ZnPPiX ou hemina, como descrito no item 4.7 de Materiais e Métodos.

As células RAW 264.7 tratadas por 24 ou 48 horas com IFN- γ ou IFN- γ + LPS apresentaram maior produção de NO em relação às células cultivadas apenas com meio de cultura (ANOVA, $p < 0,05$) (Figuras 4A, 4B, barras brancas). A adição de ZnPPiX ou hemina aos macrófagos não induz um aumento na produção de NO, embora células tratadas com hemina durante 48 horas apresentaram uma produção mais elevada de NO em comparação com células tratadas apenas com ZnPPiX (teste t de *Student*, $p = 0,0166$) (Figura 4B, barras cinzas). A adição de ZnPPiX aos macrófagos estimulados com IFN- γ ou IFN- γ + LPS não potencializa a produção de NO, assim como a adição de hemina aos macrófagos estimulados com IFN- γ (Figura 4). Entretanto, a adição de hemina aos macrófagos estimulados durante 24 ou 48 horas com IFN- γ + LPS estimula maior produção de NO em relação às células tratadas apenas com IFN- γ + LPS (teste t de *Student*, $p < 0,0002$ e $p = 0,0127$, respectivamente) ou com ZnPPiX + IFN- γ + LPS (teste t de *Student*, $p = 0,0002$) (Figuras 4A, 4B). De forma geral, o tratamento com hemina aparentemente induz uma maior produção de NO pelas células RAW 264.7 do que aquelas tratadas com ZnPPiX.

Quando as células foram infectadas com *T. gondii*, observou-se que o parasito, de maneira geral, diminui a produção de NO em ambas as condições de tratamento (Figuras 4A, 4B, barras pretas). Para a condição 24 horas de tratamento foi observado que as células RAW 264.7 infectadas e tratadas com IFN- γ ou IFN- γ + ZnPPiX apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de nitrito em relação as mesmas condições na ausência do parasito (teste t de *Student*, $p = 0,0004$; $p = 0,0192$, respectivamente) (Figura 4A). De forma similar, na condição 48 horas de tratamento os macrófagos RAW 264.7 infectados com *T. gondii* apresentaram baixos níveis de NO mesmo quando tratados com IFN- γ ou IFN- γ + ZnPPiX (teste t de *Student*, $p = 0,0014$; $p < 0,0059$, respectivamente) (Figura 4B). Apesar da produção de NO induzida por IFN- γ + hemina ter sido reduzida diante da infecção por *T. gondii* (teste t de *Student*, $p = 0,0027$), as células que receberam esse estímulo por 24 ou 48 horas apresentaram maior concentração de nitrito no sobrenadante do que as células apenas infectadas (ANOVA, $p < 0,05$) ou do que as células tratadas com IFN- γ + ZnPPiX (teste t de *Student*, $p < 0,0001$) (Figuras 4A, 4B).

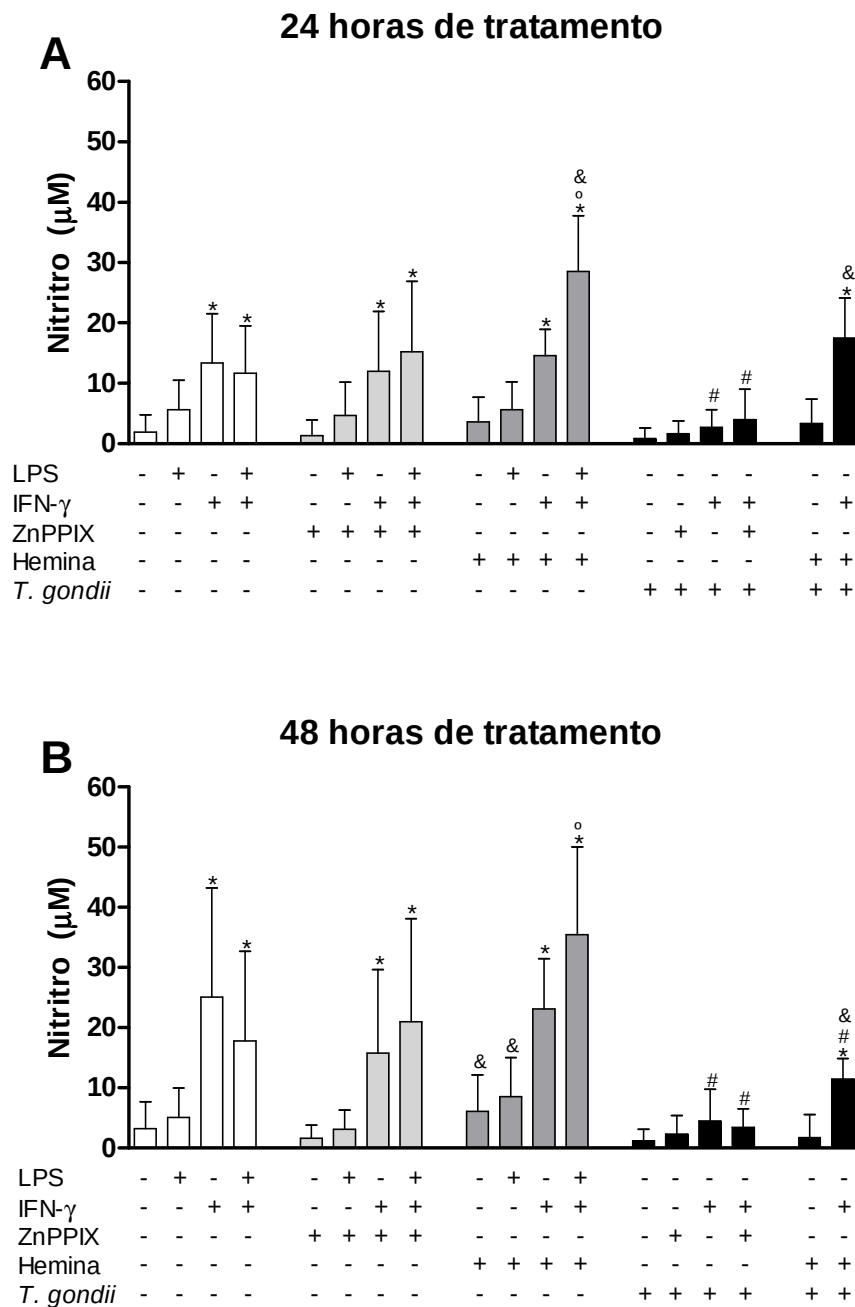


Figura 4. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos estimulados e/ou infectados com *T. gondii*. Células RAW 264.7 foram tratadas com IFN- γ (1,5 ng/ml) e/ou LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) na ausência (barras brancas) ou presença do inibidor (ZnPPiX – 10 μM ; barras cinza claro) ou indutor (hemina – 10 μM ; barras cinza escuro) da heme oxigenase-1 (HO-1); além disso, macrófagos infectados com *T. gondii* (barras pretas) foram ou não tratados com hemina ou ZnPPiX e/ou IFN- γ por 24 (A) ou 48 horas (B). A concentração de nitrito no sobrenadante de cultura foi determinada pelo método de Griess. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata para cada condição. *Diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (meio, ZnPPiX, hemina ou *T. gondii*) de cada condição (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p < 0,05$). #Comparação entre macrófagos infectados com *T. gondii* e aqueles nas mesmas condições não infectados (teste *t* de Student, $p < 0,05$). °Diferença estatística entre células tratadas com hemina e aquelas nas mesmas condições na ausência de hemina, ZnPPiX ou *T. gondii* (teste *t* de Student, $p < 0,05$). &Diferenças estatísticas significantes entre os macrófagos nas mesmas condições, tratados com ZnPPiX ou hemina (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

5.4. Níveis de bilirrubina no soro de animais tratados com o indutor ou inibidor da HO-1

Com o intuito de verificar se a infecção por *T. gondii* é capaz de induzir a atividade de HO-1, os níveis de bilirrubina foram mensurados em amostras de soro de animais infectados. Além disso, o efeito de inibição ou indução da atividade de HO-1 por ZnPPiX ou hemina, respectivamente, também foi analisado pela detecção dos níveis de bilirrubina no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados 24 horas antes e 11 dias após a infecção por *T. gondii*. Soros de animais não tratados e não infectados foram usados como controle.

Para ambas as linhagens, foi observado que os níveis de bilirrubina aumentam durante a infecção por *T. gondii* (ANOVA, $p < 0,05$) (Figuras 5A, 5B), indicando que a infecção pelo parasito aumenta a atividade da HO-1. Contudo, o tratamento com ZnPPiX foi capaz de diminuir os níveis de bilirrubina no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 (ANOVA, $p < 0,05$) (Figuras 5A, 5B), indicando que a droga é capaz de reduzir, pelo menos em parte, a atividade de HO-1. Por outro lado, quando os camundongos foram tratados com hemina, observou-se um aumento nos níveis de bilirrubina no soro dos camundongos de ambas as linhagens (ANOVA, $p < 0,05$) (Figuras 5A, 5B), sugerindo que essa droga é capaz de aumentar a atividade da enzima. Os animais BALB/c apresentam aparentemente maiores níveis de bilirrubina e consequentemente maior atividade da HO-1 em comparação aos animais C57BL/6 (Figuras 5A, 5B).

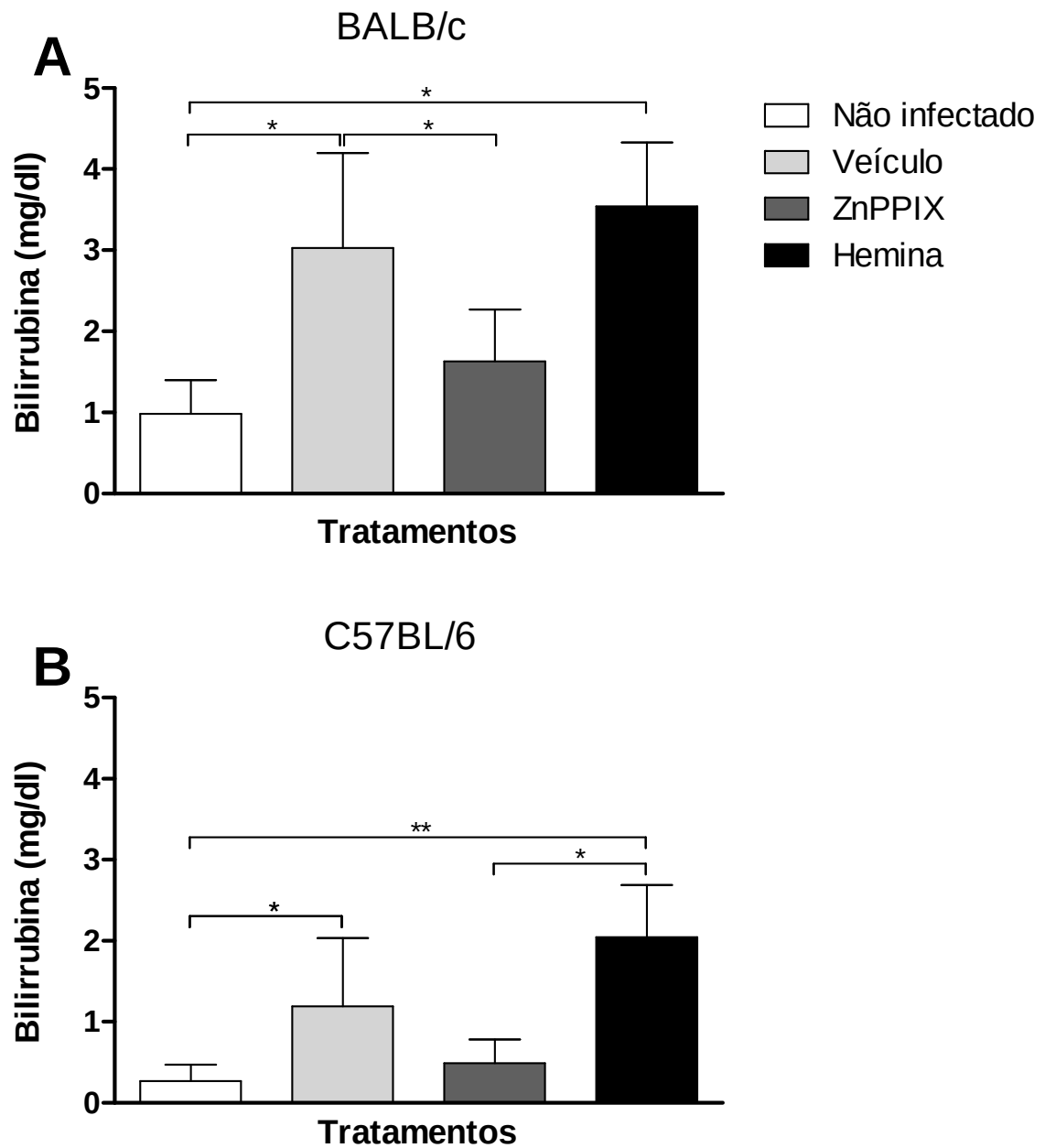


Figura 5. Níveis de bilirrubina no soro de animais BALB/c (**A**) e C57BL/6 (**B**) infectados com 5 cistos de *T. gondii* e tratados com ZnPPiX (10 mg/kg/dia), hemina (5 mg/kg/dia) ou apenas com o veículo (Na_2CO_3 + salina). Os níveis de bilirrubina foram mensurados no soro dos animais como um indicativo da atividade de HO-1, através da utilização de um kit analítico. *Comparação entre as diferentes condições de tratamento (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p < 0,05$).

5.5. Parâmetros clínicos e mortalidade dos animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados com ZnPPiX ou hemina

Após o tratamento com hemina e ZnPPiX seguido da infecção oral com 5 cistos de *T. gondii*, os camundongos BALB/c e C57BL/6 foram observados diariamente quanto aos parâmetros clínicos e avaliados por escores de morbidade e alteração de peso corporal (Figuras 6, 7). Em ambas as linhagens, os animais apresentaram escores de morbidade maiores que zero a partir do 6º dia de infecção (Figura 6A). O escore médio dos animais BALB/c tratados com ZnPPiX ou hemina foi semelhante ao escore médio dos animais tratados apenas com o veículo (Figura 6A), sugerindo que a atividade de HO-1 não influenciou nos parâmetros clínicos observados decorrentes da infecção por *T. gondii*. A inibição ou indução da atividade de HO-1 também não alterou o escore médio de morbidade dos animais C57BL/6 (Figura 6A), entretanto, foi observado uma clara tendência para um maior escore de morbidade nos animais tratados com o inibidor da HO-1 e uma diminuição nesse parâmetro nos animais tratados com o indutor da enzima. Além disso, os camundongos C57BL/6 apresentaram escores médios de morbidade mais elevados do que os animais BALB/c nas mesmas condições de tratamento (Figura 6A).

Na análise das alterações de peso corporal dos animais em relação ao primeiro dia de tratamento com ZnPPiX ou hemina (dia -1 de infecção), foi constatado que, semelhante ao escore médio de morbidade, os animais de ambas as linhagens perderam peso a partir do 6º dia de infecção (Figura 6B). Os animais BALB/c apresentaram alterações do peso corporais médios semelhantes quando tratados com ZnPPiX, hemina ou veículo (Figura 6B). Com relação aos animais C57BL/6, estes também não apresentaram alterações no peso corporal médio em virtude da indução ou inibição da atividade de HO-1 (Figura 6B). Porém, os animais C57BL/6 tratados apenas com o veículo apresentaram uma significativa redução do peso corporal médio em relação aos animais BALB/c nas mesmas condições de tratamento (teste *t* de Student, $p=0,0326$) (Figura 6B). De forma semelhante, os animais C57BL/6 apresentaram uma redução do peso corporal maior que os camundongos BALB/c tanto diante do tratamento com ZnPPiX quanto hemina (Figura 6B).

Os camundongos foram também observados diariamente quanto à mortalidade após a indução ou inibição da atividade de HO-1 e infecção por *T. gondii*. O acompanhamento da mortalidade seguiu até o 12º dia de infecção, quando os animais foram sacrificados. Todos os camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados e tratados com ZnPPiX ou hemina sobreviveram até o dia 12 após a infecção (Figura 7). Com relação ao tratamento apenas com o veículo, os animais BALB/c sobreviveram até o dia de sacrifício, ao passo que apenas um

animal C57BL/6 não sobreviveu à infecção por *T. gondii* (Figura 7). Os dados mostram que os animais C57BL/6 são mais suscetíveis à infecção pelo parasito em comparação aos animais BALB/c e que ao menos para os camundongos C57BL/6 a indução da atividade da HO-1 parece estar relacionada a diminuição do escore de morbidade desses animais durante infecção com *T. gondii*.

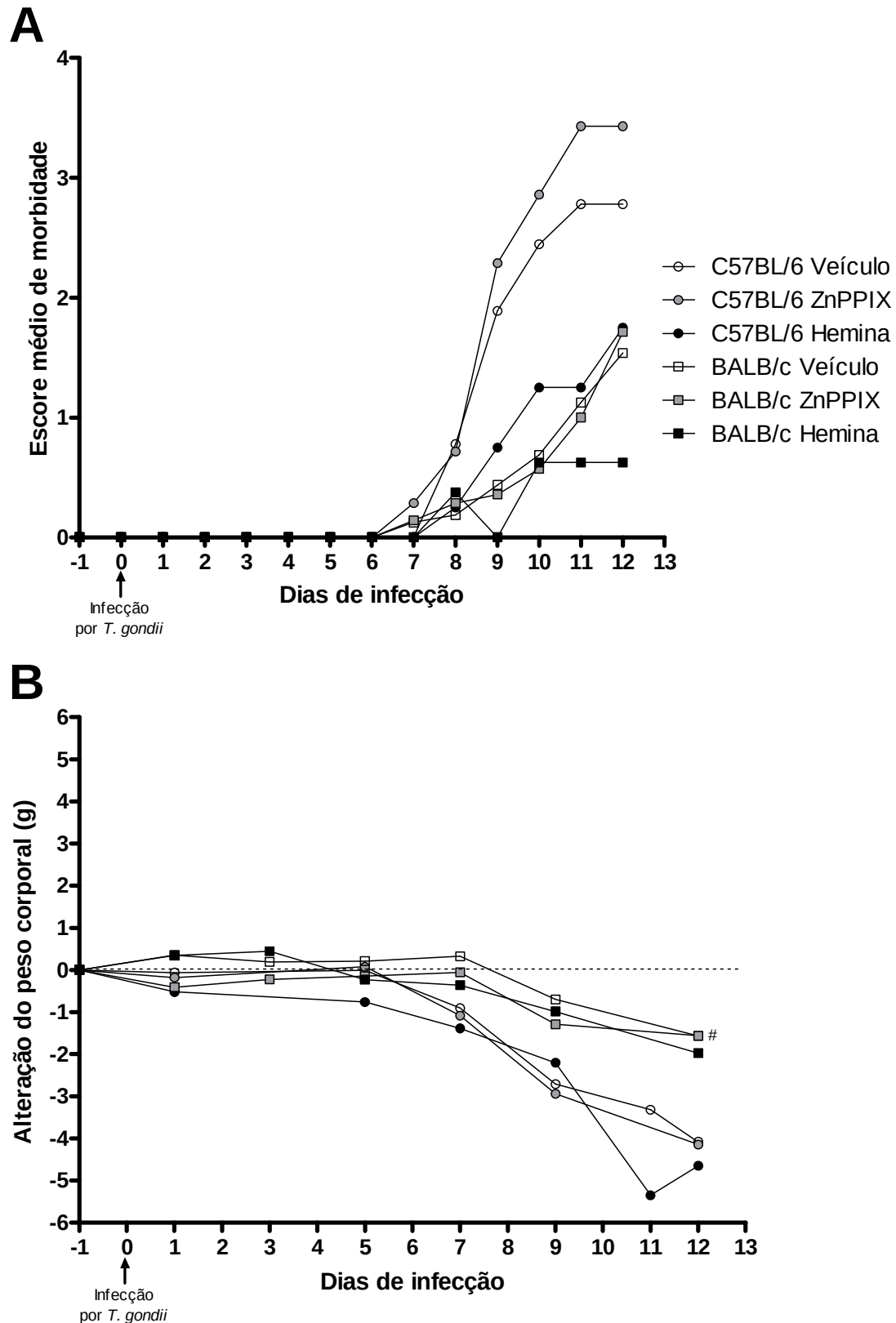


Figura 6. Escores médios de morbidade (A) e alterações de peso corporal (B) de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com ZnPPiX (10 mg/kg/dia), hemina (5 mg/kg/dia) ou apenas veículo (Na_2CO_3 + salina) e infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*. #Diferenças estatísticas significantes entre os animais BALB/c e C57BL/6 nas mesmas condições de tratamento (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p < 0,05$).

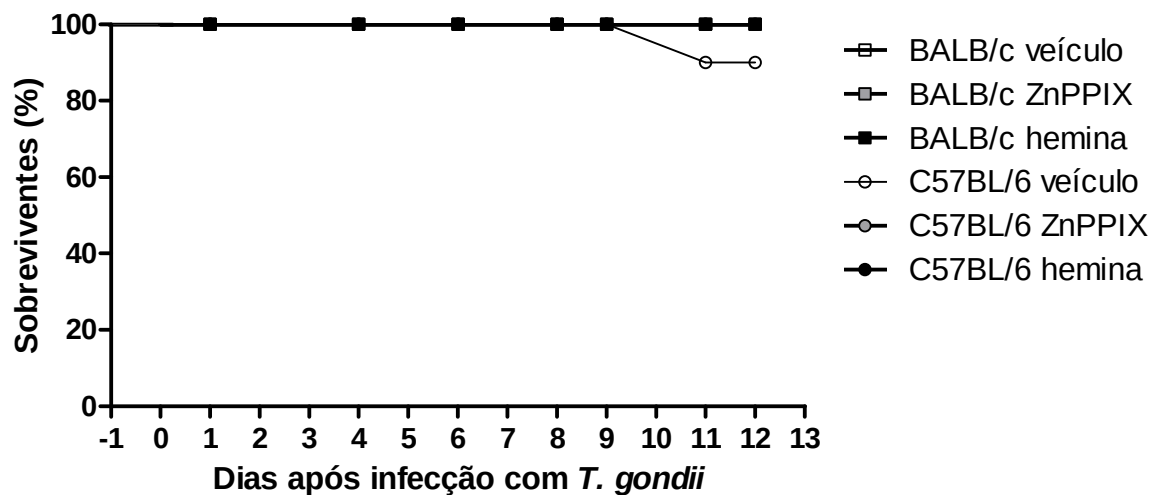


Figura 7. Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com ZnPPiX (10 mg/kg/dia), hemina (5 mg/kg/dia) ou veículo (Na_2CO_3 + salina). Não foi observada diferença estatística entre os grupos ou linhagens analisadas. Dados representativos de três experimentos independentes contendo uma média de 7 animais por grupo. (Teste do Quiquadrado (χ^2) e long-rank teste).

5.6. A atividade da enzima HO-1 não está envolvida nas alterações histológicas desencadeadas pela infecção por *T. gondii*

Devido à maior suscetibilidade e maior reação inflamatória dos animais C57BL/6 infectados com *T. gondii* em relação aos animais BALB/c, observado em estudos anteriores (SILVA *et al.* 2010), decidimos verificar se a indução da HO-1 estaria envolvida na diminuição da inflamação nos animais infectados e se a inibição da enzima estaria envolvida no aumento da inflamação nesses animais.

Os pulmões dos camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 12 de infecção apresentaram alterações inflamatórias que se caracterizaram pela presença de infiltrados inflamatórios nos septos alveolares, constituídos por células mononucleadas. Estas lesões são características de uma pneumonia intersticial. Quando a atividade da enzima HO-1 foi induzida pelo tratamento com hemina ou inibida pelo tratamento com ZnPPiX, não se observou alteração na gravidade das lesões entre os animais da linhagem BALB/c ou C57BL/6 (Figura 8A). Entretanto, as lesões foram mais intensas no tecido pulmonar dos animais C57BL/6 tratados com o veículo, ZnPPiX ou hemina em comparação com os animais BALB/c nas mesmas condições de tratamento (teste *t* de Student, veículo $p=0,0169$; ZnPPiX $p=0,0258$)(Figuras 8A, 9A, 9B).

Aos 12 dias de infecção com *T. gondii*, o fígado apresentou infiltrado de células inflamatórias, principalmente mononucleadas, organizados como focos pelo parênquima. Os animais BALB/c tratados com hemina apresentaram lesões menos graves em comparação com os animais tratados com ZnPPiX (ANOVA, $p<0,05$)(Figura 8B). Em relação aos

camundongos C57BL/6, o fígado apresentou lesões similares entre as condições de tratamento, entretanto, os animais dessa linhagem apresentaram lesões inflamatórias mais intensas em comparação com os animais BALB/c nas mesmas condições de tratamento (teste *t* de *Student*, veículo $p=0,0052$; ZnPPiX $p=0,0026$; hemina $p=0,0024$) (Figuras 8B, 9C, 9D). Além disso, a maioria dos camundongos C57BL/6 infectados apresentou focos de necrose pelo parênquima.

As lesões do intestino delgado dos animais infectados foram constituídas por infiltrado de células inflamatórias mononucleadas na lamina própria e na submucosa. As lesões intestinais nos camundongos BALB/c foram suaves e não se observou diferença na intensidade destas entre as três condições de tratamento (Figura 8C). Em algumas áreas do intestino de camundongos C57BL/6 infectados foram observados também aumento da espessura dos vilos intestinais e perda focal das células epiteliais da superfície desses, o que indica início de necrose. Camundongos C57BL/6 tratados com o inibidor da HO-1 ou o indutor da enzima ou veículo apenas apresentaram lesões similares (Figura 8C). As lesões no intestino delgado dos camundongos C57BL/6 infectados foram mais intensas em relação aos camundongos BALB/c nas mesmas condições de tratamento (teste *t* de *Student*, veículo $p=0,0037$; ZnPPiX $p=0,0050$; hemina $p=0,0006$) (Figuras 8C, 9E, 9F).

Aos 12 dias de infecção o SNC de ambas as linhagens de camundongos apresentou lesões leves, com infiltração de células inflamatórias nas meninges e manguito perivascular em alguns animais. Nesse tempo de infecção as lesões no SNC foram mais suaves em relação aos órgãos periféricos (Figura 8D). Observou-se que o cérebro dos camundongos BALB/c apresentou lesões mais intensas quando tratados com hemina em relação aos animais tratados com veículo apenas ou ZnPPiX (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 8D). Os camundongos C57BL/6 apresentaram lesões brandas e similares independente do tratamento utilizado, e não se observou diferença estatística em qualquer condição de tratamento quando comparado com os animais BALB/c nas mesmas condições de tratamento (Figura 8D).

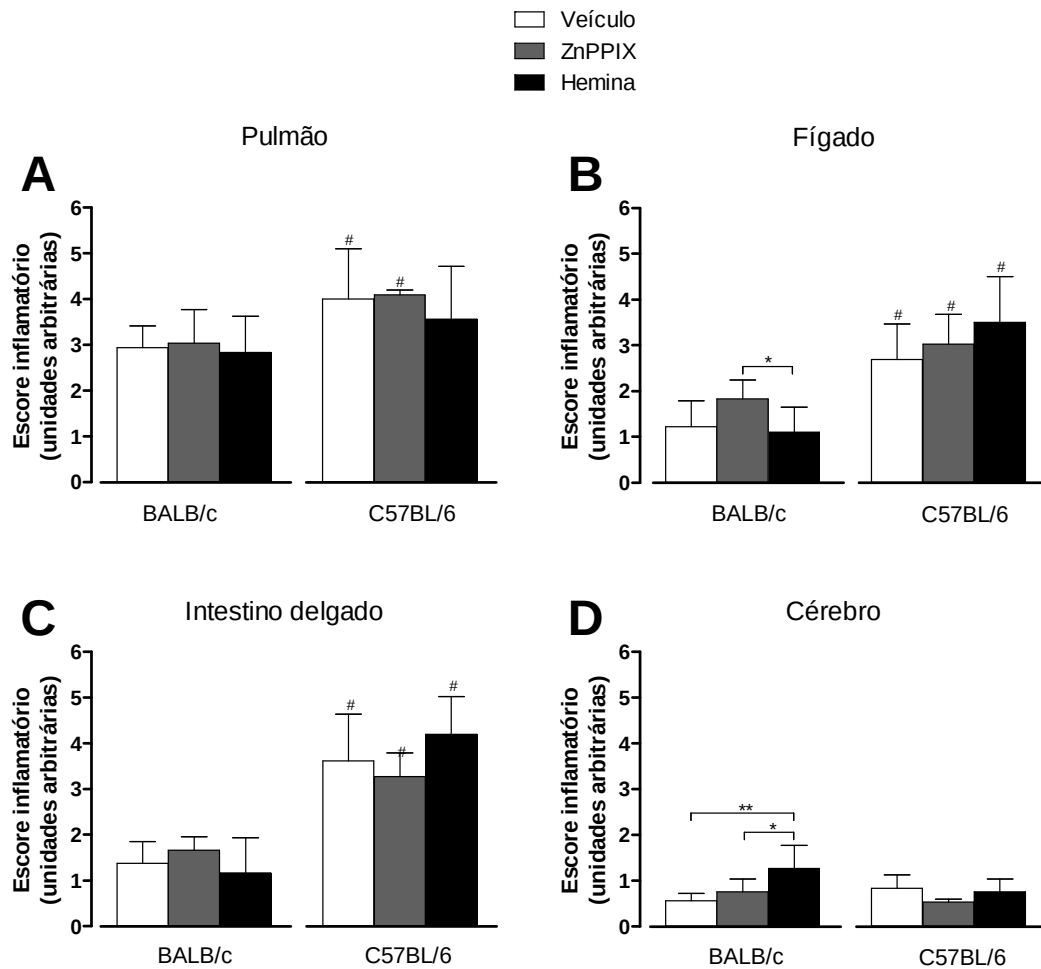


Figura 8. Escore inflamatório no pulmão (A), fígado (B), intestino delgado (C) e cérebro (D) de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com ZnPPiX (10 mg/kg/dia), hemina (5 mg/kg/dia) ou veículo (Na_2CO_3 + salina) e infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*. Os dados foram obtidos através da análise de 40 campos microscópicos por secção tecidual de cada órgão, de pelo menos 6 animais por grupo, usando a objetiva de 40x de aumento. *Diferença estatística significativa entre camundongos da mesma linhagem tratados em condições diferentes (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p < 0,05$). #Comparação entre camundongos de linhagens diferentes nas mesmas condições de tratamento (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

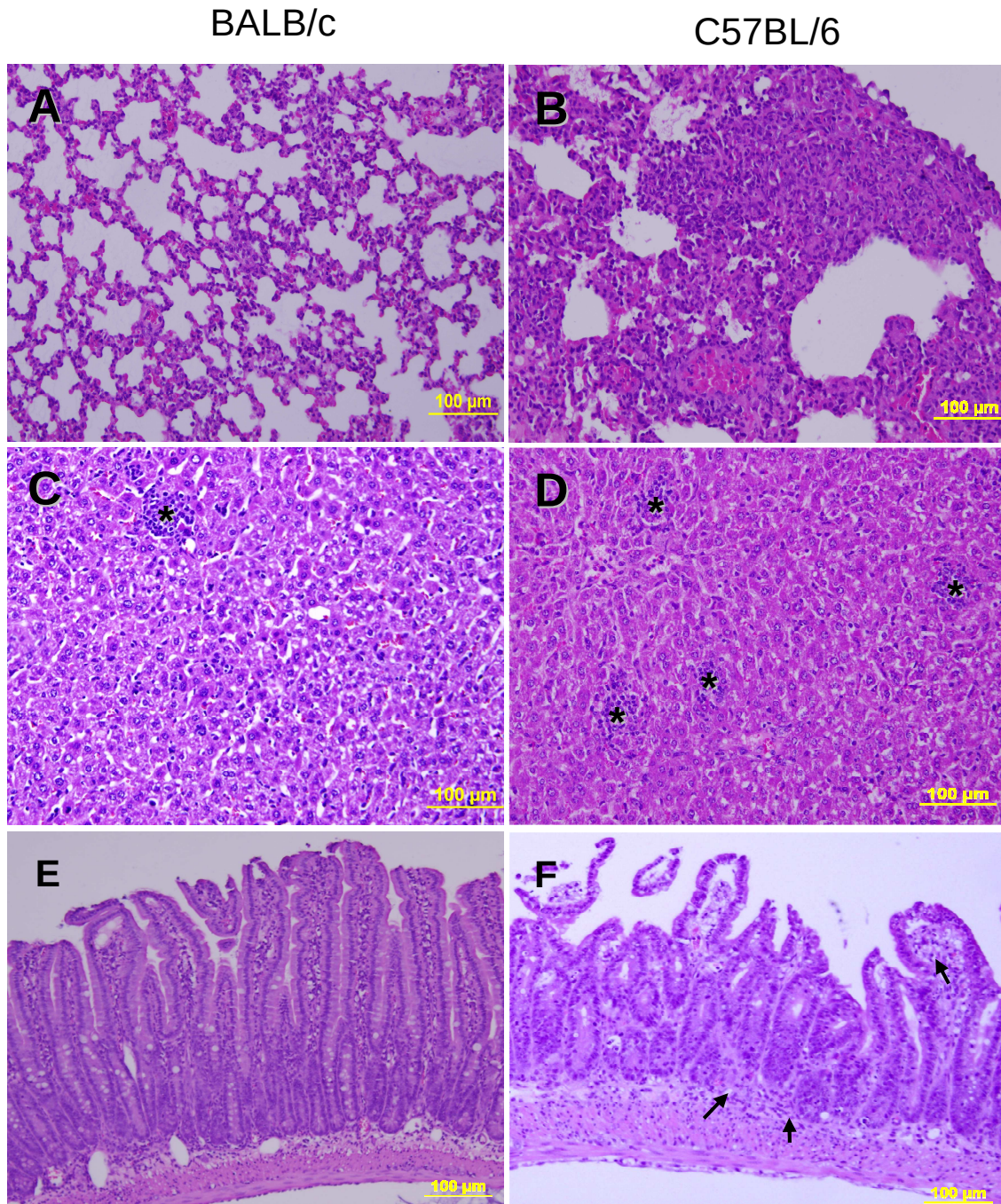


Figura 9. Fotomicrografias representativas do pulmão (A, B), fígado (C, D) e intestino delgado (E, F) de animais BALB/c e C57BL/6 infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*. As fotomicrografias são representativas dos animais tratados com ZnPPiX (10 mg/kg/dia), hemina (5 mg/kg/dia) ou veículo (Na_2CO_3 + salina), que apresentaram lesões similares dentro da mesma linhagem de camundongos independentemente do tratamento administrado. Todas as imagens apresentadas são provenientes de animais tratados com veículo apenas. Septos pulmonares de BALB/c (A) e C57BL/6 (B) no dia 12 após a infecção; focos inflamatórios (asteriscos) no fígado de camundongos BALB/c (C) e C57BL/6 (D); e infiltrados inflamatórios discretos ou proeminentes (setas) no intestino delgado de camundongos BALB/c (E) e C57BL/6 (F), respectivamente. Coloração por HE. Barra, 100µm.

5.7. A atividade da enzima HO-1 está envolvida no controle de *T. gondii* no pulmão de animais BALB/c e C57BL/6

O parasitismo tecidual, detecção de estruturas semelhantes a cistos e vacúolos parasitóforos foi investigado por imunohistoquímica nos órgãos periféricos de ambas as linhagens de camundongos.

No dia 12 após a infecção com *T. gondii*, os animais C57BL/6 apresentaram um alto parasitismo no tecido pulmonar comparados aos camundongos BALB/c (teste *t* de *Student*, veículo $p=0,0062$; ZnPPiX $p=0,0042$) (Figura 10A). Quando a atividade da HO-1 foi reduzida pelo tratamento com ZnPPiX, ambas as linhagens apresentaram um aumento significativo na carga parasitária nesse importante sítio de infecção (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 10A). Os camundongos BALB/c tratados com hemina apresentaram um parasitismo tecidual semelhante aos animais tratados apenas com o veículo e um menor número de parasitos em relação aos animais tratados com ZnPPiX (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 10A). O efeito da atividade de HO-1 parece ser mais evidente nos camundongos suscetíveis C57BL/6, uma vez que o tratamento com hemina induziu uma menor carga parasitária comparada aos animais tratados com ZnPPiX (ANOVA, $p<0,05$) e apresentou uma tendência em diminuir o parasitismo quando comparados aos animais tratados com o veículo apenas (Figura 10A).

Com relação ao parasitismo tecidual no fígado, foi observado que ambas as linhagens apresentaram poucos parasitos nesse órgão independentemente do tratamento recebido (Figura 10B), sendo que apenas alguns animais de cada grupo apresentaram algum parasito no órgão.

No intestino delgado foi observado que os animais C57BL/6 apresentaram um alto parasitismo quando comparados aos BALB/c (teste *t* de *Student*, veículo $p=0,0023$; ZnPPiX $p=0,0335$) (Figura 10C). A indução ou inibição da atividade HO-1 não interferiu no controle do parasitismo no intestino delgado de animais BALB/c (Figura 10C). Com relação aos C57BL/6, de acordo com os nossos experimentos, a redução da atividade de HO-1 através do tratamento com ZnPPiX não alterou o parasitismo tecidual no intestino, embora a indução da enzima pela ação de hemina foi capaz de controlar o parasitismo nesse órgão (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 10C). Os resultados mostram que a atividade da HO-1 é fundamental pra controlar o parasitismo por *T. gondii* no pulmão de camundongos infectados e esse efeito parece ser mais evidente nos tecidos dos animais C57BL/6. Além disso, a indução da atividade enzimática no intestino delgado acima dos níveis basais parece ser importante para controlar o parasito no órgão dos camundongos C57BL/6.

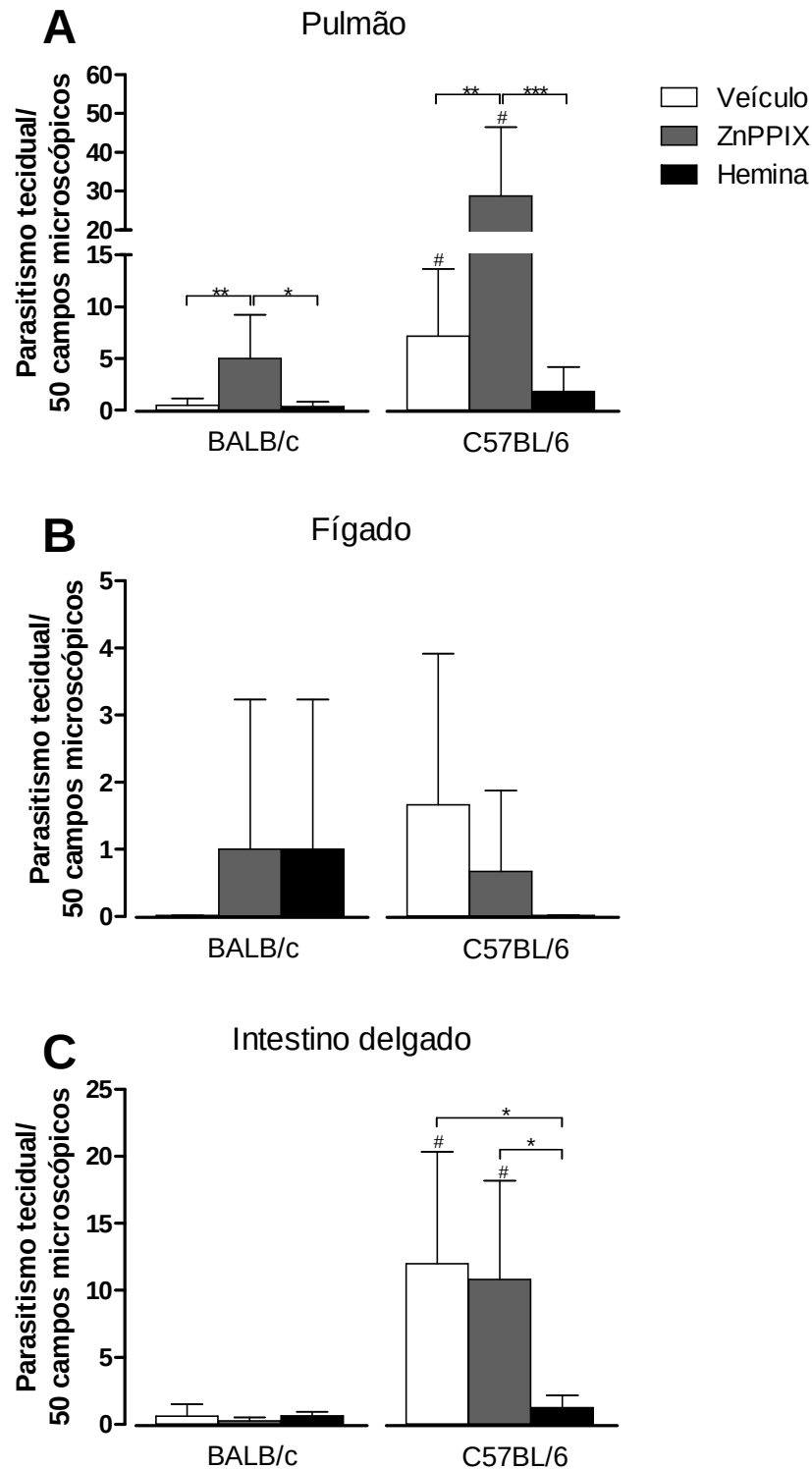


Figura 10. Parasitismo tecidual no pulmão (A), fígado (B) e intestino delgado (C) de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com ZnPPiX (10 mg/kg/dia), hemina (5 mg/kg/dia) ou veículo (Na_2CO_3 + salina). O parasitismo tecidual foi detectado por reação de imunohistoquímica e quantificado através da contagem de números de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cistos em 50 campos microscópicos de cada secção tecidual. Os dados são representativos de pelo menos 6 animais por grupo. *Diferenças estatísticas significantes entre as condições experimentais de animais da mesma linhagem (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p < 0,05$). #Comparação entre ambas as linhagens submetidas às mesmas condições de tratamento (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

5.8. Níveis das citocinas, IFN- γ , TNF, TGF- β e IL-10 no soro de animais infectados e tratados com ZnPPiX ou hemina

A produção de citocinas foi analisada no soro de animais BALB/c e C57BL/6 tratados com ZnPPiX, hemina ou apenas com o diluente das drogas (veículo) aos 12 dias de infecção com *T. gondii*. Foi observado que a infecção por *T. gondii* induziu a produção de IFN- γ em ambas as linhagens (Figura 11A), sendo que essa maior produção da citocina foi estatisticamente significativa nos animais BALB/c tratados com hemina (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Além disso, o perfil de produção da citocina foi semelhante entre as duas linhagens de camundongos. Contudo, a indução ou inibição da atividade de HO-1 não alterou a produção de IFN- γ em ambas as linhagens aos 12 dias de infecção (Figura 11A).

A infecção por *T. gondii* estimulou a produção de TNF em ambas as linhagens de camundongos aos 12 dias de infecção (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Figura 11B). Os níveis de TNF foram significativamente maiores nos animais C57BL/6 em relação aos animais BALB/c, independente do tratamento utilizado (teste Mann Whitney, veículo $p = 0,0286$; ZnPPiX $p = 0,0079$; hemina $p = 0,0079$) (Figura 11B). Porém, o tratamento dos animais BALB/c com ZnPPiX ou hemina não desencadeou alterações na produção de TNF. Com relação aos animais C57BL/6, houve uma menor produção da citocina em animais tratados com ZnPPiX do que aqueles tratados com o veículo (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Apesar disso, os níveis de TNF no soro de animais C57BL/6 foram semelhantes nos animais tratados com ZnPPiX ou hemina (Figura 11B).

Os níveis de TGF- β apresentaram-se aparentemente aumentados durante a infecção por *T. gondii* nos animais BALB/c e C57BL/6 tratados com veículo apenas e hemina (Figura 11C). Além disso, os animais C57BL/6 tratados com hemina apresentaram uma maior produção da citocina do que os animais BALB/c nas mesmas condições (teste Mann Whitney, $p = 0,0212$) (Figura 11C). A inibição ou indução da atividade de HO-1 nos animais BALB/c não alterou a produção de TGF- β (Figura 11C). Contudo, nos animais C57BL/6 os níveis de TGF- β foram menores naqueles animais tratados com ZnPPiX em relação aos animais tratados com hemina (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Figura 11C), sugerindo que a inibição da atividade de HO-1 diminui a produção de TGF- β enquanto que a indução da enzima resulta no aumento dos níveis dessa citocina.

Em relação à produção de IL-10, os animais C57BL/6 infectados com *T. gondii* apresentaram aparentemente níveis mais elevados da citocina no soro do que os animais não infectados (Figura 11D). Resultado semelhante foi observado nos animais BALB/c (teste

Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), porém, quando esses foram tratados com ZnPPiX, os níveis de IL-10 apresentaram-se bastante reduzidos (Figura 11D). Com relação à indução da atividade de HO-1, o tratamento com hemina não alterou os níveis de IL-10 no soro de camundongos BALB/c infectados. De forma semelhante, o tratamento com hemina, bem como o tratamento com ZnPPiX, não alteraram a produção de IL-10 nos camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* (Figura 11D).

Além disso, foi realizada também a dosagem de IL-12p70 no soro dos animais infectados. Porém, os níveis da citocina no soro dos animais não foram detectáveis em nenhuma das condições experimentais.

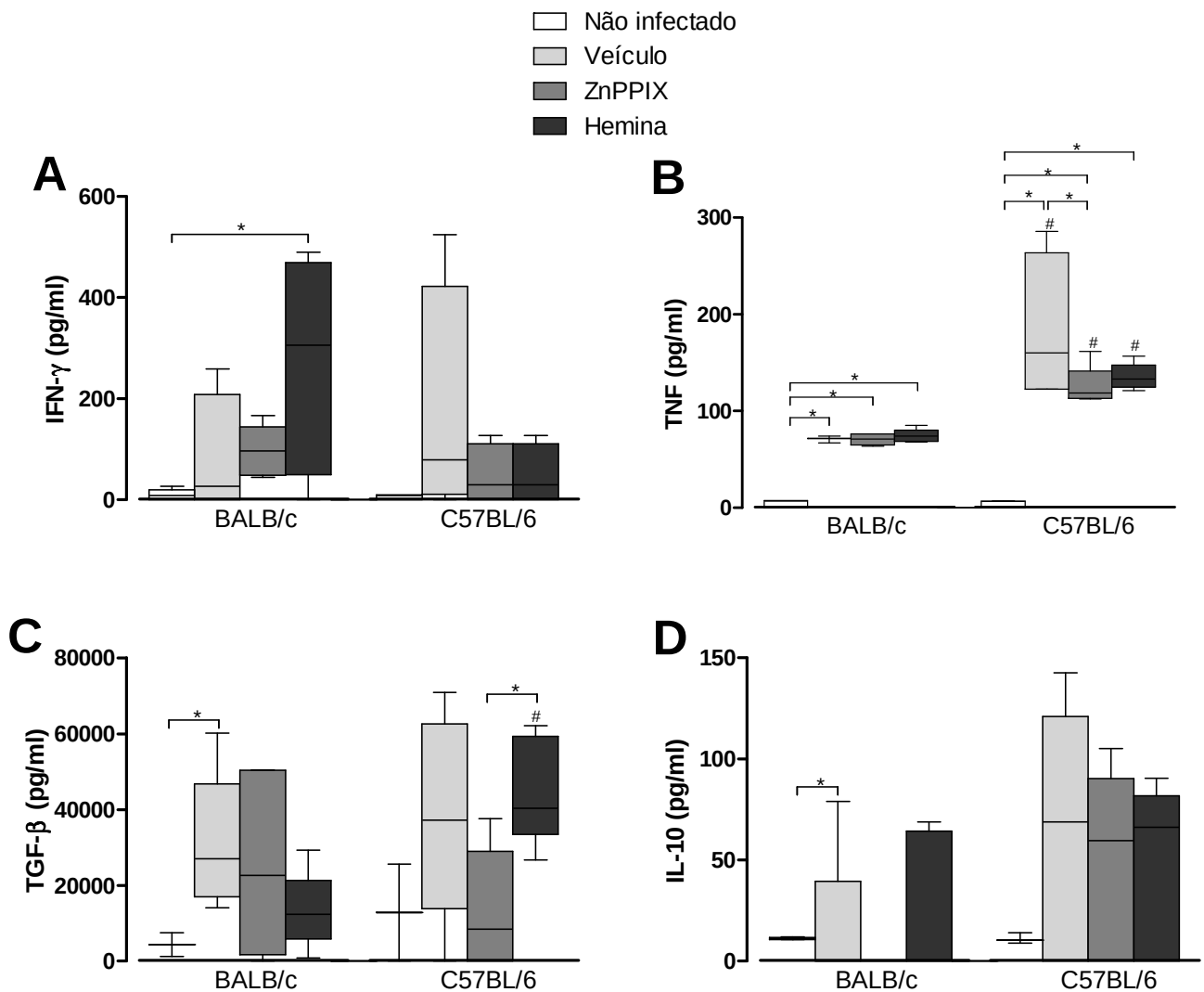


Figura 11. Níveis de citocinas nas amostras de soro dos camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com ZnPPiX (10 mg/kg/dia), hemina (5 mg/kg/dia) ou veículo (Na_2CO_3 + salina) aos 12 dias de infecção por via oral com 5 cistos de *T. gondii*. Os níveis de IFN- γ (A), TNF (B), TGF- β (C) e IL-10 (D) foram mensurados pelo imunoensaio enzimático (ELISA) sanduíche. *Diferença estatística significativa entre as condições experimentais em cada linhagem (Kruskal Wallis, $p < 0,05$). # Diferença estatística significativa entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 nas mesmas condições de tratamento (Mann Whitney, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Estudos anteriores tem mostrado o papel da enzima HO-1 em algumas doenças parasitárias, como malária (PAMPLONA *et al.*, 2007; EPIPHANIO *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2009) e leishmaniose (PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005). Desta forma, o presente estudo objetivou verificar se a enzima HO-1 poderia também participar da resposta imune a infecção por *T. gondii* tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Primeiramente, macrófagos RAW 264.7 foram tratados com estímulos capazes de controlar o parasitismo. Foi observado que as células RAW 264.7 tratadas com IFN- γ apresentaram uma diminuição na replicação do parasito e no número de células infectadas nas condições de 24 e 48 horas de tratamento. Em concordância com os nossos resultados, na presença de IFN- γ , células da linhagem HeLa (BARBOSA *et al.*, 2008) ou CaCO₂, uma linhagem de células humanas intestinais, (DIMIER; BOUT, 1997) infectadas com a cepa RH de *T. gondii* ou astrócitos infectados com a cepa ME49 (HALONEN;WEISS, 2000), são capazes de controlar a replicação de *T. gondii*. Foi demonstrado recentemente que quando células RAW 264.7 são tratadas com LPS ou com extratos de plantas conhecidas por seus efeitos anti-inflamatórios, induzem um aumento na atividade de HO-1, como uma via endógena de proteção (ABUARQOUB *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2006; HWANGBO *et al.*, 2009). Nas condições experimentais do presente estudo, quando as células infectadas foram tratadas com o inibidor da HO-1, foi observado que a redução da atividade de HO-1 diminuiu a proliferação do parasito e uma significativa diminuição no número de células infectadas. Nossos resultados também mostraram que a indução da atividade de HO-1 através do tratamento com hemina aumentou a replicação de *T. gondii* e a porcentagem de células infectadas na condição de 48 horas de tratamento. Isso sugere que o bloqueio da atividade de HO-1, mesmo que parcial, através do tratamento com ZnPIX, induz mecanismos envolvidos no controle do parasito, ao passo que o tratamento com hemina poderia estar inibindo esses mecanismos. Além disso, efeitos do tratamento com hemina são mais acentuados na condição de 48 horas de tratamento. Isso pode ser explicado pelo fato de que na condição 48 horas as células receberam um tratamento prévio à infecção e o tempo de exposição aos agentes moduladores da atividade de HO-1 também foi maior nessa condição, o que poderia levar a um melhor bloqueio ou indução da enzima.

O NO possui papel importante no controle da replicação de *T. gondii* em macrófagos murinos ativados (ADAMS *et al.*, 1990). Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento com IFN- γ ou o tratamento duplo com IFN- γ + LPS induziram uma alta produção

de NO pelas células RAW 264.7. De forma semelhante, outros trabalhos mostraram que macrófagos murinos tratados com IFN- γ e/ou LPS por 24 ou 48 horas apresentaram uma maior produção de NO do que células não tratadas (LÜDER *et al.*, 2003). Contudo, os macrófagos infectados por *T. gondii* diminuem a produção de NO, independente do tratamento ou não com IFN- γ , como um provável mecanismo de evasão do parasito, em ambas as condições de tratamento, como demonstrado por estudos anteriores (DOBBIN *et al.*, 2002; LÜDER *et al.*, 2003 ZIMMERMANN *et al.*, 2006). O NO é apenas um dentre os muitos estímulos que podem induzir a expressão de HO-1 (DATTA; LIANOS, 1999) e condições de estresse oxidativo induzidas por NO podem ser reduzidas pelas propriedades antioxidantes de HO-1, sugerindo um importante “feedback” negativo (SHENG *et al.*, 2010). Trabalhos anteriores demonstraram que a indução de HO-1 desencadeia uma diminuição nos níveis de NO, como uma resposta defensiva ao efeito citotóxico causado pelo NO (HARA *et al.*, 1999). Outros estudos também mostraram que macrófagos RAW 264.7 tratados com hemina na concentração de 50 ou 100 μ M diminuem significativamente a produção de NO em comparação aos macrófagos tratados apenas com LPS (HU *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que o tratamento com hemina na concentração de 10 μ M aumentou a produção de NO nos macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ , sugerindo que doses mais elevadas de hemina sejam necessárias para bloqueio da produção de NO, quando estas células são tratadas com duplo estímulo pró-inflamatório. A redução da atividade de HO-1 não influenciou a produção de NO em macrófagos infectados com *T. gondii* e estimulados com IFN- γ . O tratamento com ZnPPiX aumenta a expressão de RNAm da iNOS em células infectadas por *Escherichia coli* (VAREILLE *et al.*, 2008), e o tratamento com protoporfirina de estanho (SnPPiX), um outro inibidor da HO-1, potencializa a produção de NO em astrócitos estimulados com IL-1 β (SHENG *et al.*, 2010). Nossos resultados mostram que o efeito da redução da atividade de HO-1 é dependente do estímulo utilizado e do tipo celular analisado. Na presença de *T. gondii* o tratamento com hemina não alterou a produção de NO em relação às células apenas infectadas. Inesperadamente, quando a atividade de HO-1 é induzida por hemina em células infectadas e tratadas com IFN- γ , observou-se um aumento significativo na produção de NO. Dados adicionais são necessários para o entendimento desse mecanismo de ação da HO-1 juntamente com IFN- γ na produção de NO em macrófagos infectados, uma vez que a enzima HO-1 possui efeitos diversos que podem variar de acordo com o microambiente na qual ela se encontra (DONG *et al.*, 2000; MAINES; GIBBS, 2005).

Posteriormente, foi investigado o papel da HO-1 na infecção experimental em camundongos BALB/c e C57BL/6. Os resultados *in vivo* mostraram que a atividade da HO-1 é aumentada durante a toxoplasmose experimental, uma vez que os camundongos infectados com *T. gondii* apresentaram altos níveis de bilirrubina quando comparados com animais não infectados. Interessantemente, a atividade de HO-1 parece ser mais alta em camundongos BALB/c do que C57BL/6, uma vez que os níveis de bilirrubina foram mais altos no soro dos animais resistentes (BALB/c) do que animais suscetíveis (C57BL/6). O aumento da síntese da proteína HO-1 ocorre em geral como uma resposta ao estresse em sistemas biológicos (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Foi previamente demonstrado que a enzima é induzida em muitas situações de inflamação, como em infecções *in vivo* e *in vitro* por *Mycobacterium tuberculosis* (SHILOH; MANZANILLO; COX, 2008), fibrose hepática em ratos (WANG; DUAN; SUN, 2009) e danos hepáticos agudos (WEN *et al.*, 2007), infecções por *P. chabaudi chabaudi* em camundongos BALB/c (SEIXAS *et al.*, 2009), em animais infectados com *P. berghei* (PAMPLONA *et al.*, 2007) e inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina em camundongos BALB/c (LEE *et al.*, 2010).

Uma vez que os efeitos anti-inflamatórios da HO-1 tem sido bem caracterizados (OTTERBEIN *et al.*, 2003), nós sugerimos que a inibição da atividade de HO-1 poderia aumentar os infiltrados inflamatórios na infecção por *T. gondii*, ao passo que a indução da enzima pela ação da hemina poderia atenuar as alterações histológicas induzidas pelo parasito. Entretanto, os resultados aqui apresentados demonstraram que a indução ou inibição da atividade da HO-1 nos níveis obtidos nos nossos experimentos não influenciaram expressivamente as alterações histológicas nos órgãos dos animais C57BL/6 ou BALB/c no dia 12 após a infecção. De acordo com nossos experimentos prévios (SILVA *et al.*, 2010), a infecção por *T. gondii* induz alterações histológicas mais acentuadas nos órgãos de animais C57BL/6 quando comparado com animais BALB/c. Estudos anteriores tem demonstrado que, durante a malária cerebral experimental, a inibição da HO-1 ou a deleção de HO-1 (codificada por *Hmox1*) em camundongos resistentes BALB/c levou a uma ruptura da barreira hematoencefálica e congestão microvascular cerebral com leucócitos ativados e glóbulos vermelhos (PAMPLONA *et al.*, 2007). Apesar de nossos resultados mostrarem que a indução da HO-1 em camundongos resistentes BALB/c desencadeou lesões inflamatórias mais acentuadas nos SNC comparado com animais nas outras condições de tratamento, esses resultados não são relevantes devido ao fato de serem ainda lesões leves, quando comparadas com alterações inflamatórias mais graves nos órgãos periféricos. Em camundongos suscetíveis C57BL/6, a indução da HO-1 por CoPPPIX reduz a ruptura da barreira

hematoencefálica e diminuiu a congestão da microvasculatura cerebral (PAMPLONA *et al.*, 2007). Além disso, durante a infecção por *Plasmodium*, o fígado de animais HO^{-/-} (“background” C57BL/6 e BALB/c) apresentou maior quantidade de focos inflamatórios, os quais tinham maior extensão (EPIPHANIO *et al.*, 2008), e a expressão de HO-1 no fígado diminuiu a necrose em camundongos DBA/2 (SEIXAS *et al.*, 2009). Outros estudos sugerem que a inibição de HO-1 potencializa a migração, rolamento e adesão de neutrófilos durante processos inflamatórios, e que a indução de HO-1 é capaz de diminuir o recrutamento dessas células (FREITAS *et al.*, 2006). Em modelo murino de doenças agudas no pulmão ou no fígado, a indução da atividade de HO-1 através de reagentes farmacológicos reduz as alterações histopatológicas (WEN *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2010), enquanto o tratamento com ZnPPiX aumenta tais alterações no fígado (WEN *et al.*, 2007), mas não no pulmão de camundongos tratados (YIN *et al.*, 2010). Como o parasito é prontamente controlado no fígado de animais infectados (SILVA *et al.*, 2010), não observamos maior ou menor alteração inflamatória no tecido hepático dos animais infectados, quando estes foram tratados com ZnPPiX ou hemina respectivamente. No pulmão, também não observamos nenhum efeito na resposta inflamatória em animais infectados e tratados com o inibidor ou indutor da HO-1. Esses dados estão de acordo com Yin e colaboradores (2010), que também não observaram efeito pró-inflamatório de ZnPPiX nesse órgão. No caso da infecção por *T. gondii*, a indução da atividade de HO-1 não foi suficiente para reduzir a intensa resposta pró-inflamatória desencadeada por esse parasito em todos os sítios de infecção.

Apesar das alterações inflamatórias decorrentes da infecção por *T. gondii* não serem modificadas pela atividade de HO-1, nossos resultados mostraram que a atividade dessa enzima participa no controle da replicação de *T. gondii* durante a infecção experimental. O parasitismo tecidual no pulmão, um importante sítio de infecção, de animais C57BL/6 ou BALB/c tratados com ZnPPiX foi maior do que naqueles animais tratados com hemina ou veículo aos 12 dias de infecção. Em camundongos C57BL/6 foi observado que o tratamento com hemina reduziu o parasitismo no tecido pulmonar. Animais BALB/c, que normalmente apresentam um pequeno parasitismo no intestino em infecção por *T. gondii*, não apresentaram nenhuma alteração no parasitismo quando tratados com ZnPPiX ou hemina. No intestino delgado dos animais C57BL/6, foi verificado que o tratamento com ZnPPiX não altera significativamente o parasitismo tecidual. No entanto, quando os animais são tratados com hemina, o indutor da HO-1, diminuiu significativamente o parasitismo. Esses dados sugerem que a indução da enzima a níveis mais elevados que os basais no intestino delgado induzem mecanismos envolvidos no controle desse parasito em camundongos C57BL/6. De forma

semelhante à replicação de *T. gondii* nos animais C57BL/6 tratados com hemina, a indução da HO-1 por esse agente farmacológico ou CoPPIX reduziu a replicação do vírus da hepatite humana (HCV) em hepatócitos humanos, mas o mecanismo de ação desses indutores de HO-1 na replicação viral ainda não foi elucidado (SHAN *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2008). Porém, a HO-1 parece ter um papel diferente nos estágios iniciais da malária, uma vez que a alta expressão de HO-1 em camundongos leva a um aumento na carga parasitária de *P. berghei* no fígado e o tratamento de animais BALB/c e C57BL/6 com CO, um produto final da via catalítica de HO-1, aumenta o parasitismo, sugerindo que as propriedades anti-inflamatórias de HO-1 são favoráveis a replicação desse parasito (EPIPHANIO *et al.*, 2008). Estudos prévios têm demonstrado que o tratamento com ZnPPIX não altera a replicação parasitária durante a malária cerebral experimental (PAMPLONA *et al.*, 2007). Os dados em conjunto sugerem que dependendo do agente etiológico infeccioso utilizado, a HO-1 influencia de maneira diversa os mecanismos de controle parasitário.

Durante a infecção experimental por *T. gondii*, há um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , TNF e IL-6, no soro de animais infectados (WAGNER *et al.*, 2008). Os resultados apresentados neste trabalho também mostraram que os níveis de TNF e IFN- γ são aumentados durante a infecção por *T. gondii* nas linhagens BALB/c e C57BL/6, embora a indução ou inibição da atividade de HO-1 não alterou os níveis de IFN- γ . Os camundongos C57BL/6 apresentaram maior produção de TNF do que os camundongos BALB/c aos 12 dias de infecção. A maior produção de citocinas pró-inflamatórias nos animais C57BL/6, no presente estudo, pode estar relacionada com as alterações histológicas mais intensas nesses camundongos, levando os mesmos a uma perda maior de peso e escores de morbidade mais elevados. Em concordância com os nossos resultados, outro trabalho mostrou que animais C57BL/6 infectados por via oral com a cepa 76K de *T. gondii* apresentam maiores níveis no soro de TNF e IFN- γ aos 9 dias de infecção. Além disso, o reflexo da suscetibilidade dos animais C57BL/6 é visto na maior perda de peso corporal desses animais em relação aos animais BALB/c (MORAMPUDI *et al.*, 2011). Porém, durante o curso da infecção por *T. gondii* o pico máximo de produção de IFN- γ e TNF ocorre por volta do 8º dia de infecção; a partir desse ponto, os níveis de ambas as citocinas apresentam uma tendência a diminuição (KANG *et al.*, 2006; WAGNER *et al.*, 2008). Os nossos resultados representam os níveis de citocinas detectados no soro de animais aos 12 dias de infecção por *T. gondii*. Sendo assim, há uma heterogeneidade nos níveis de citocinas dentre os animais da mesma linhagem, uma vez que alguns deles já podem estar na fase de declínio de produção de

citocinas. Além disso, a inibição parcial da atividade de HO-1 levou a uma diminuição dos níveis de TNF no soro dos camundongos C57BL/6. Em contraste, estudos anteriores mostraram que quando células do baço de camundongos HO-1^{-/-} são estimuladas com LPS, apresentam uma alta produção de IFN- γ e TNF (KAPTURCZAK *et al.*, 2004). Além disso, os níveis de TNF em macrófagos murinos estimulados com LPS são diminuídos quando as células são tratadas com hemina (HU *et al.*, 2009).

A expressão de citocinas anti-inflamatórias TGF- β e IL-10 é aumentada em fígado de ratos quando há uma indução da expressão de HO-1, ocorrendo também uma diminuição da expressão de IL-2 e TNF (LIANG SUN *et al.*, 2011). Os nossos resultados também mostraram que a indução da atividade de HO-1 através do tratamento com hemina aumentou os níveis de TGF- β em camundongos C57BL/6 em relação aos animais tratados com ZnPPiX, sugerindo um aumento nas atividades anti-inflamatórias nesses animais. Contudo, os níveis de IL-10 não foram alterados no soro de animais C57BL/6 infectados e tratados com hemina ou ZnPPiX. É sabido que na fase aguda de infecção por *T. gondii* ocorre um aumento na produção de IL-10 (WAGNER *et al.*, 2008). Esta citocina é importante na resistência à infecção por *T. gondii* tanto em camundongos BALB/c quanto C57BL/6 (SUZUKI *et al.*, 2000), uma vez que altos níveis de IL-10 associados com baixos níveis de IFN- γ resulta em uma menor inflamação nos órgãos periféricos de camundongos C57BL/6 (GUITON *et al.*, 2010). A manutenção da produção de TNF, associado a uma tendência em aumento na produção TGF- β em animais C57BL/6 tratados com hemina pode ter contribuído de alguma forma para o menor parasitismo pulmonar e intestinal e menor escore de morbidade verificado nesses animais.

Nossos resultados *in vitro* mostraram que a inibição da atividade de HO-1 foi capaz de diminuir a replicação de *T. gondii* em macrófagos infectados enquanto que a indução da atividade da enzima aumentou a replicação do parasito. Contrariamente, nossos resultados *in vivo* demonstraram que a inibição da atividade de HO-1 aumentou a replicação parasitária no pulmão de camundongos infectados e que a indução da atividade de HO-1 no pulmão e intestino delgado de animais C57BL/6 reduziu a replicação parasitária. Essa discrepância entre os resultados *in vitro* e *in vivo* ressalta a importância em definir o contexto no qual a enzima é analisada, devido ao fato de HO-1 ser induzida por muitos estímulos de origens diferentes (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a inibição da HO-1 pelo tratamento com ZnPPiX diminui a expressão da IDO em células dendríticas estimuladas com LPS *in vivo* e *in vitro*, indicando que a expressão de IDO mediada por LPS

pode ser regulada por uma via dependente de HO-1 (JUNG *et al.*, 2010). Estudos prévios mostraram que a redução do triptofano disponível devido a degradação pela IDO desencadeia um controle da replicação de *T. gondii* tanto *in vitro* (CERÁVOLO *et al.*, 1999; CHAVES *et al.*, 2001) quanto *in vivo* (FUJIGAKI *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Nossos resultados sugerem a hipótese de que a inibição de HO-1 poderia levar a inibição de IDO e, conseqüentemente, altos níveis de triptofano ficariam disponíveis para a replicação parasitária no pulmão, uma vez que investigações prévias demonstraram a alta expressão de IDO e degradação do triptofano no pulmão de camundongos C57BL/6 durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* (FUJIGAKI *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Embora a expressão da IDO no intestino delgado não tenha sido elucidada durante a infecção por *T. gondii*, outros estudos demonstraram que a IDO é importante durante respostas inflamatórias nesse sítio de infecção (CHERAYIL, 2009), e que a enzima tem um papel protetor nas infecções pela bactéria entérica patogênica *Citrobacter rodentium* (HARRINGTON *et al.*, 2008). Os nossos resultados sugerem que a infecção por *T. gondii* não foi capaz de induzir a atividade de HO-1 no intestino delgado, uma vez que o tratamento com ZnPPiX não alterou o parasitismo nesse órgão, porém, quando a enzima é induzida acima dos níveis basais através do tratamento com hemina, a atividade de HO-1 reduz a carga parasitária. Então, a atividade de HO-1 no controle do parasitismo no intestino delgado, pelo menos nos animais C57BL/6, poderia estar relacionada à indução de IDO, degradação do triptofano e diminuição da replicação de *T. gondii*. Assim, novas investigações são necessárias para elucidar se a via da HO-1 desencadeia um efeito na expressão de IDO e degradação de triptofano no pulmão e intestino delgado durante a infecção por *T. gondii*.

7. CONCLUSÕES

- A inibição parcial da atividade de HO-1 em macrófagos RAW 264.7 infectados com *T. gondii* diminui a replicação do parasito, enquanto que a indução de HO-1 tem como consequência o aumento do parasitismo total nessas células;
- Os mecanismos moduladores da replicação de *T. gondii* desencadeados pela atividade de HO-1 podem ser, pelo menos em parte, independentes da produção de NO pelas células RAW 264.7 infectadas;
- A infecção por *T. gondii* aumenta a atividade da enzima HO-1 tanto na linhagem de camundongo resistente BALB/c quanto na linhagem suscetível C57BL/6;
- As alterações histológicas no pulmão, fígado, intestino delgado e cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *T. gondii* são independentes da atividade de HO-1;
- O parasitismo tecidual no tecido pulmonar de camundongos BALB/c e C57BL/6 é aumentado diante da inibição parcial da atividade de HO-1;
- A indução da atividade da HO-1 é importante para controlar *T. gondii* no pulmão e intestino delgado de animais suscetíveis C57BL/6;
- *In vivo*, a HO-1 parece não interferir potencialmente nos níveis de citocinas no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 aos 12 dias de infecção com *T. gondii*.

De maneira geral, os dados do presente estudo sugerem que os mecanismos mediados pela atividade de HO-1 durante a infecção por *T. gondii* desencadeiam efeitos diferentes nas infecções *in vivo* daqueles apresentados durante a infecção no microambiente celular.

8. REFERÊNCIAS*

ABUARQOUB, H.; FORESTI, R.; GREEN, C.J.; MOTTERLINI, R. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory actions of 2'-hydroxychalcone in RAW 264.7 murine macrophages. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 290, p. 1092–1099, 2006.

ADAMS, L.B.; HIBBS, J.B.; TAINTOR, J.R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 7, p. 2725–2729, 1990.

AJZENBERG, D.; YERA, H.; MARTY, P.; PARIS, L.; DALLE, F.; MENOTTI, J.; AUBERT, D.; FRANCK, J.; BESSIERES, M.; QUINIO, D.; PELLOUX, H.; DELHAES, L.; DESBOIS, N.; THULLIEZ, P.; ROBERT-GANGNEUX, F.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; PUJOL, S.; RABODONIRINA, M.; BOUGNOUX, M.; CUISENIER, B.; DUHAMEL, C.; DUONG, T.H.; FILISETTI, D.; FLORI, P.; GAY-ANDRIEU, F.; PRATLONG, F.; NEVEZ, G.; TOTET, A.; CARME, B.; BONNABAU, H.; DARDÉ, M.; VILLENA, I. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 1155–1167, 2009.

AMEREDES, B.T.; OTTERBEIN, L.E.; KOHUT, L.K.; GLIGONIC, A.L.; CALHOUN, W.J.; CHOI, A.M.K. Low-dose carbon monoxide reduces airway hyperresponsiveness in mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, p. 1270–1276, 2003.

APPLEFORD, P.J.; SMITH, J.E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1187–1191, 2000.

Balla, G.; Jacob, H.S.; Balla, J.; Rosenberg, M.; Nath, K.; Apple, F.; Eaton, J.W.; Vercellottig, G.M. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 25, p. 18148–18153, 1992.

BALLA, J.; BALLA, G.; JENEY, V.; KAKUK, G.; JACOB, H. S.; VERCELLOTTI, G. M. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword – promotion or oxidation and induction of cytoprotectants. **Blood**, v. 95, n. 11, 2000.

*Segundo as normas da ABNT 2002.

BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clinical Experimental Immunology**, v. 151, n. 3, p.536–545, 2008.

BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.O.; COSTA, I.N.; PENA, J.D.O.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, p. 624–630, 2007.

BARTLEY, P.M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v.135, n. 4, p.421-432, 2006.

BENEVIDES, L.; MILANEZI, C.M.; YAMAUCHI, L.M.; BENJAMIM, C.F.; SILVA, J.S.; SILVA, N.M. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 3, p. 741-751, 2008.

BIBURGER, M.; THEINER, G.; SCHÄDLE, M.; SCHULER, G.; TIEGS, G. Pivotal Advance: Heme oxygenase 1 expression by human CD4⁺ T cells is not sufficient for their development of immunoregulatory capacity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, p. 193–202, 2010.

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607–623, 2000.

BLISS, S.K.; ZHANG, Y.; DENKERS, E.Y. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 4, p. 2081-2088, 1999.

BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 438–442, 2002.

BURT, T.D.; SEU, L.; MOLD, J.E.; KAPPAS, A.; MCCUNE, J.M. Naive human T cells are activated and proliferate in response to the heme oxygenase-1 inhibitor tin mesoporphyrin. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5279–5288, 2010

CARRUTHERS, V.B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. **Parasitology International**, v. 48, p. 1-10, 1999.

CERÁVOLO, I.P.; CHAVES, A.C.; BONJARDIM, C.A.; SIBLEY, D.; ROMANHA, A.J.; GAZZINELLI, R.T. Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanosoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2233–2240, 1999.

CHAVES, A.C.; CERÁVOLO, I.P.; GOMES, J.A.; ZANI, C.L.; ROMANHA, A.J.; GAZZINELLI, R.T. IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 2, p. 333–344, 2001.

CHERAYIL, B.J. Indoleamine 2,3-dioxygenase in intestinal immunity and inflammation. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 9, p.1391–1396. 2009.

CICCARELLI, A.; ARAUJO, L.; BATLLE, A.; LOMBARDO, E. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 134, p. 959-965, 2006.

COZZI, A.; LEVI, S.; CORSI, B.; SANTAMBROGIO, P.; CAMPANELLA, A.; GERARDI, G.; AROSIO, P. Role of iron and ferritin in TNF α -induced apoptosis in HeLa cells. **FEBS Letters**, v. 537, p. 187–192, 2003.

DATTA, P.K.; LIANOS, E.A. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. **Kidney International**, v.55, n. 5, p. 1734–1739, 1999.

DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 569–588, 1998.

DIMIER, I.H. ; BOUT, D.T. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN-gamma-activated human intestinal epithelial cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 75, n. 5, p.511–514, 1997.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 141, n.7, p. 2407-2412, 1988.

DOBBIN, C.A.; SMITH, N.C.; JOHNSON, A.M. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 958–965, 2002.

DONG, Z.; LAVROVSKY, Y.; VENKATACHALAM, M.A.; ROY, A.K. Heme oxygenase-1 in tissue pathology. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1485–1488, 2000.

DUBEY, J.P. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, n. 55, v. 6, p. 467–475, 2008.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57–72, 2004.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, 2008.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

ELMORE, A.; JONES, J.L.; CONRAD, P.A.; PATTON, S.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190–196, 2010.

EPIPHANIO, S.; MIKOLAJCZAK, S.A.; GONÇALVES, L.A.; PAMPLONA, A.; PORTUGAL, S.; ALBUQUERQUE, S.; GOLDBERG, M.; REBELO, S.; ANDERSON, D.G.; AKINC, A.; VORNLOCHER, H.P.; KAPPE, S.H.I.; SOARES, M.P.; MOTA, M.M. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine *Plasmodium* liver infection. **Cell Host and Microbe**, v. 3, p. 331–338, 2008.

FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 355–359, 2002.

FERREIRA, A.; BALLA, J.; JENEY, V.; BALLA, G.; SOARES, M. P. A central hole for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p. 1097–1111, 2008.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 40, n. 1, p. 71–80, 2004.

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. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, n. 4, p. 345–354, 2006.

FUJIGAKI, S.; SAITO, K.; TAKEMURA, M.; MAEKAWA, N.; YAMADA, Y.; WADA, H.; SEISHIMA, M. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by

Toxoplasma gondii infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 779–786, 2002.

GAZZINELLI, R.T.; HAKIM, F.T.; HIENY, S.; SHEARER, G.M.; SHER, A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 286–292, 1991.

GAZZINELLI, R.T.; HAYASHI, S.; WYSOCKA, M.; CARRERA, L.; KUHN, R.; MULLER, W.; ROBERGE, F.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n.5, p. 9, 1994.

GAZZINELLI, R.T.; HU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactive chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 1, p. 175–180, 1992.

GEORGE, J.F.; BRAUN, A.; BRUSKO, T.M.; JOSEPH, R.; BOLISETTY, S.; WASSERFALL, C.H.; ATKINSON, M.A.; AGARWAL, A.; KAPTURCZAK M.H. Suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. **The American Journal of Pathology**, v.173, n. 1, p. 154–160, 2008.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M.P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 323–354, 2010.

GREEN, L.C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNEMBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GROJEAN, S.; KOZIEL, V.; VERT, P.; DAVAL, J.L. Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons. **Experimental Neurology**, v. 166, p. 334–341, 2000.

GUITON, R.; VASSEUR, V.; CHARRON, S.; ARIAS, M.T.; VAN LANGENDONCK, N.; BUZONI-GATEL, D.; RYFFEL, B.; DIMIER-POISSON, I. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 3, p. 427–435, 2010.

GUO, S.B.; DUAN, Z.J.; LI, Q.; SUN, X.Y. Effect of heme oxygenase-1 on renal function in rats with liver cirrhosis. **The World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 3, p. 322–328, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Hemáceas, anemia e policitemia. In:_____. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap.32, p.419-428.

HALONEN, S.K.; WEISS, L.M. Investigation into the mechanism of gamma interferon-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3426–3430, 2000.

HARA, E.; TAKAHASHI, K.; TAKEDA, K.; NAKAYAMA, M.; YOSHIZAWA, M.; FUJITA, H.; SHIRATO, K.; SHIBAHARA, S. Induction of heme oxygenase-1 as a response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors. **Pharmacology Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 227–236, 1999.

HARRINGTON, L.; SRIKANTH, C.V.; ANTONY, R.; RHEE, S.J.; MELLOR, A.L.; SHI, H.N.; CHERAYIL, B.J. Deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances commensal-induced antibody responses and protects against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3045–3053, 2008.

HAYASHI, S.; OMATA, Y.; SAKAMOTO, H.; HIGASHIMOTO, Y.; HARA, T.; SAGARA, Y.; NOGUCHI, M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. **Gene**, v.336, p.241–50, 2004

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HU, C.M.; LIU, Y.H.; CHEAH, K.P.; LI, J.S.; LAM, C.S.K.; YU, W.Y.; CHOY, C.S. Heme oxygenase-1 mediates the inhibitory actions of brazilin in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 79–85, 2009.

HUGHES, H.P.A. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitology Today**, v. 4, n. 12, p. 340-347, 1988.

HWANGBO, C.; LEE, H.S.; PARK, J.; CHOE, J.; LEE, J.H. The anti-inflammatory effect of tussilagone, from *Tussilago farfara*, is mediated by the induction of heme oxygenase-1 in murine macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 1578–1584. 2009.

JANSEN, T.; HORTMANN, M.; OELZE, M.; OPITZ, B.; STEVEN, S.; SCHELL, R.; KNORR, M.; KARBACH, S.; SCHUHMACHER, S.; WENZEL, P.; MÜNZEL, T.; DAIBER, A. Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1 – evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, p. 186–195, 2010.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Waterborne toxoplasmosis – recent developments. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 10–25, 2010.

JUNG, I.D.; LEE, J.S.; LEE, C.M.; NOH, K.T.; JEONG, Y.I.; PARK, W.S.; CHUN, S.H.; JEONG, S.K.; PARK, J.W.; SON, K.H.; HEO, D.R.; LEE, M.G.; SHIN, Y.K.; KIM, H.W.; YUN, C.H.; PARK, Y.M. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase expression via heme oxygenase-1-dependant pathway during murine dendritic cell maturation. **Biochemical Pharmacology**, v.80, n. 4, p. 491–505, 2010.

KANG, K.M.; CHOI, I.U.; SHIN, D.W.; LEE, Y.H. Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamethasone. **Korean Journal of Parasitology**, v. 44, n. 3, p. 209–219, 2006.

KAPTURCZAK, M.H.; WASSERFALL, C.; BRUSKO, T.; CAMPBELL-THOMPSON, M.; ELLIS, T.M.; ATKINSON, M.A.; AGARWAL, A. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. **American Journal of Pathology**, v. 165, p. 1045–1053, 2004.

KESHAVAN, P.; DEEM, T.L.; SCHWEMBERGER, S.J.; BABCOCK, G.F.; COOK-MILLS, J.M.; ZUCKER, S.D. Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3709–3718, 2005.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A.L.; RIZZO, L.V.; BELFORT JR, R.; VITOR, R.W.A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L.D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KIM, B.C.; CHOI, J.W.; HONG, H.Y.; LEE, S.A.; HONG, S.; PARK, E.H.; SEONG-JIN KIM, S.J.; LIM, C.J. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of mushroom *Phellinus linteus* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 364–371, 2006.

LANGERMANS, J.A.; HULST, M.E.; NIBBERING, P.H.; FURTH, R. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma*

gondii and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5107-5112, 1992.

LEE, M.Y.; SEO, C.S.; LEE, J.A.; LEE, N.H.; KIM, J.H.; HA, H.; MING-SHAN, Z.; SON, J.K.; SHIN, H.K. Anti-asthmatic effects of *Angelica dahurica* against ovalbumin-induced airway inflammation via upregulation of heme oxygenase-1. **Food and Chemical Toxicology**, 2010.

LÜDER, C.G.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N.; GROSS, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. **International Journal of Parasitology**, v. 33, n. 8, p.833–844, 2003.

MAINES, M.D.; GIBBS, P.E.M. 30 some years of heme oxygenase: from a “molecular wrecking ball” to a “mesmerizing” trigger of cellular events. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 568–577, 2005.

MCLEOD, R.; SKAMENE, E.; BROWN, C.; EISENHAUER, P.B.; MACK, D.; MACK, D.G. Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of AxB/BxA recombinant inbred and B10 congenic mice. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 9, p.3031–3034, 1989a.

MCLEOD, R.; EISENHAUER, P.; MACK, D.; BROWN, C.; FILICE, G.; SPITALNY, G. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 9, p. 3247–3255, 1989b.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lacent**, v. 363, p. 1965–76, 2004.

MORAMPUDI, V.; CRAEYE, S.; MOINE, A.L.; DETIENNE, S.; BRAUN, M.Y.; D’SOUZA, S. Partial depletion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. **Microbes and Infection**, 2011.

MORRISSETTE, N.S.; SIBLEY, L.S. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 21–38, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NILSON, D. L.; COX, M. M. Função das proteínas. In: _____. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. cap. 5, p. 156-189.

NISHI, M.; HU, K.; MURRAY, J. M.; ROOS, D. S. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 9, p. 1559-1568, 2008.

NOOR, S.; HABASHY, A.S.; NANCE, J.P.; CLARK, R.T.; NEMATI, K.; CARSON, M.J.; WILSON, E.H. CCR7-dependent immunity during acute *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2257–2263, 2010.

OTTERBEIN, L.E.; BACH, F.H.; ALAM, J.; SOARES, M.; TAO LU, H.; WYSK, M.; DAVIS, R.J.; FLAVELL, R.A.; CHOI, A.M. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nature Medicine**, v. 6, n. 4, p. 422–428, 2000.

OTTERBEIN, L.E.; CHOI, A.M.K. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p.1029–1037, 2000.

OTTERBEIN, L.E.; SOARES, M.P.; YAMASHITA, K.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 8, p. 449–455, 2003.

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. **Nature Medicine**, v. 13, n. 6, p.703–710, 2007.

PARK, J.H.; OH, S.; LIM, S.S.; LEE, Y.S.; SHIN, H.K.; OH, Y.S.; CHOE, N.H.; PARK, J.H.Y.; KIM, J.K. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 351, p. 146–152, 2006.

PFEFFERKORN, E.R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. **Journal of Interferon Research**, v. 6, n. 3, p. 267-279, 1986.

PHAM, N.H.; MOURIZ, J.; KIMA, P.E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infection and Immunity**. 2005;73(12):8322–33, 2005.

PORTO, B. N.; ALVES, L. S.; FERNÁNDEZ, P. L.; DUTRA, T. P.; FIGUEIREDO, R. T.; GRAÇA-SOUZA, A. V.; BOZZA, M. T. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24430-24436, 2007.

REY, L. Parasitologia. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 856p.

RYTER, S.W.; ALAM, J.; CHOI, A.M.K. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. **Physiological Reviews**, v. 86, p.583–650, 2006.

SARADY-ANDREWS, J.K.; LIU, F.; GALLO, D.; NAKAO, A.; OVERHAUS, M.; ÖLLINGER, R.; CHOI, A.M.; OTTERBEIN, L.E. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 289, p. 1131–1137, 2005.

SCHIPPER H.M. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 821–830, 2000.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 37, p. 15837–15842, 2009.

SHAN, Y.; ZHENG, J.; LAMBRECHT, R.W.; BONKOVSKY, H.L. Reciprocal effects of micro-RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1166–1174, 2007.

SHENG, W.S.; HU, S.; NETTLES, A.R.; LOKENSGARD, J.R.; VERCELLOTTI, G.M.; ROCK, R.B. Hemin inhibits NO production by IL-1 β -stimulated human astrocytes through induction of heme oxygenase-1 and reduction of p38 MAPK activation. **Journal of Neuroinflammation**, v 7, p. 51–60, 2010.

SHILOH, M.U.; MANZANILLO, P.; COX, J.S. *Mycobacterium tuberculosis* senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 5, p. 323–330. 2008.

SILVA, N.M.; MANZAN, R.M.; CARNEIRO, W.P.; MILANEZI, C.M.; SILVA, J.S.; FERRO, E.A.; MINEO, J.R. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 167–177, 2010.

SILVA, N.M.; RODRIGUES, C.V.; SANTORO, M.M.; REIS, L.F.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; GAZZINELLI, R.T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 859-868, 2002.

SILVA, N.M.; RODRIGUES, C.V.; SANTORO, M.M.; REIS, L.F.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; GAZZINELLI, R.T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 859-868, 2002.

SILVA, N.M.; VIEIRA, J.C.; CARNEIRO, C.M.; TAFURI, W.L. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 65-72, 2009.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M.K.; MORDUE, D.G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, p. 253-260, 2010.

SOARES, M.P.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 2, p. 50-58, 2009.

SOARES, M.P.; MARGUTI, I.; CUNHA, A.; LARSEN, R. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 482-489, 2009.

SUN, L.; SHI, T.; QIAO, H.; JIANG, X.; JIANG, H.; KRISSANSEN, G.W.; SUN, X. Hepatic overexpression of heme oxygenase-1 improves liver allograft survival by expanding T regulatory cells. **Journal of Surgical Research**, p. e1-e8, 2011.

SUZUKI, Y.; CONLEY, F.K.; REMINGTON, J.S. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 4, p. 790-793, 1989.

SUZUKI, Y.; SHER, A.; YAP, G.; PARK, D.; NEYER, L.E.; LIESENFELD, O.; MADELINE FORT, M.; KANG, H.; GUFWOLI, E. IL-10 Is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant balb/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 5375-5382, 2000.

TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R. Microsomal heme oxygenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 224, n. 23, p. 6388-6394, 1969.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TSOYI, K.; LEE, T.Y.; LEE, Y.S.; KIM, H.J.; SEO, H.G.; LEE, J.H.; CHANG, K.C. Heme-oxygenase-1 induction and carbon monoxide- releasing molecule inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced high-mobility group box 1 release *in vitro* and improve survival of mice in LPS- and cecal ligation and puncture- induced sepsis model *in vivo*. **Molecular Pharmacology**, v. 76, p. 173–182, 2009.

VAREILLE, M.; RANNOU, F.; THÉLIER, N.; GLASSER, A.L.; DE SABLET, T.; MARTIN, C.; GOBERT, A.P. Heme oxygenase-1 is a critical regulator of nitric oxide production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human enterocytes. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 8, p. 5720–5726, 2008.

WAGENER, F. A. D. T. G.; VOLK, H.; WILLIS, D.; ABRAHAM, N. D.; SOARES, M. P.; ADEMA, G. J.; FIGDOR, C. G. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 551-571, 2003.

WAGNER, A.; FÖRSTER-WALDL, E.; GARNER-SPITZER, E.; SCHABUSSOVA, I.; KUNDI, M.; POLLAK, A.; SCHEINER, O.; JOACHIM, A.; WIEDERMANN, U. Immunoregulation by *Toxoplasma gondii* infection prevents allergic immune responses in mice. **International Journal of Parasitology**, v. 39, n. 4, p.465–472, 2008.

WANG, F.; DUAN, Z.J.; SUN, Y.J. Influence of heme oxygenase-1 expression on immune liver fibrosis induced by cobalt protoporphyrin in rats. **The World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 24, p. 3009–3014, 2009.

WANG, H.; LEE, S.S.; DELL'AGNELLO, C.; TCHIPASHVILI, V.; D'AVILLA, J.; CZISMADIA, E.; CHIN, B.Y.; BACH, F.H. Bilirubin can induce tolerance to islet allografts. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 762–768, 2005.

WEN, T.; WU, Z.M.; LIU, Y.; TAN, Y.F.; REN, F.; WU, H. Upregulation of heme oxygenase-1 with hemin prevents D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute hepatic injury in rats. **Toxicology**, v. 237, n. 1-3, p. 184–193, 2007.

WOO, J.; IYER, S.; CORNEJO, M.; MORI, N.; GAO, L.; SIPOS, I.; MAINES, M.; BUELOW, R. Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). **Transplant Immunology**, v. 6, p. 84–93, 1998.

YAMASHITA, K.; MCDAID, J.; ÖLLINGER, R.; TSUI, T.Y.; BERBERAT, P.O.; USHEVA, A.; CSIZMADIA, E.; SMITH, R.N.; SOARES, M.P.; BACH, F.H. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.18, n. 6, p. 765–767, 2005.

YAP, G.S.; SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α -dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 7, p. 1083–1091, 1999.

YEUNG, N.; LU, Y. One heme, diverse functions: using biosynthetic myoglobin models to gain insights into heme-copper oxidases and nitric oxide reductases. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 8, p. 1437–1454, 2008.

YIN, H.; LI, X.; GONG, Q.; JIN, X.; GU, H.; YUAN, B.; ZHANG, B.; ZHENG, F.; GONG, F.; ZHU, J. Heme oxygenase-1 upregulation improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury involving suppression of macrophage migration inhibitory factor. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 2443–2449, 2010.

ZELENAY, S.; CHORA, A.; SOARES, M.P.; DEMENGEOT, J. Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function. **International Immunology**, v. 18, n. 1, p. 11–18, 2007.

ZHU, Z.; WILSON, A.T.; MATHAHS, M.M.; WEN, F.; BROWN, K.E.; LUXON, B.A.; SCHMIDT, W.N. Heme oxygenase-1 suppresses hepatitis C virus replication and increases resistance of hepatocytes to oxidant injury. **Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 1430–1439, 2008.

ZIMMERMANN, S.; MURRAY, P.J.; HEEG, K.; DALPKE, A.H. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN- γ signaling. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1840–1847, 2006.

ZUCKERBRAUN, B.S.; BILLIAR, T.R.; OTTERBEIN, S.L.; KIM, P.K.M.; LIU, F.; CHOI, A.M.K.; BACH, F.H.; OTTERBEIN, L.E. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 11, p. 1707–1716, 2003.

9. ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131/4335; e-mail: ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 036/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O
PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 007/09

Projeto Pesquisa: "Papel da Heme – oxigenase na infecção experimental de camundongos
BALB/ c por Toxoplasma gondii".

Pesquisador Responsável: Neide Maria da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos
limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER
INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA
MESMA.

11

Uberlândia, 14 de julho de 2009.

Prof. Dr. José Roberto Mineo
Coordenadora do CEUA/UFU
pro - tempore