

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular

Caracterização do papel da enzima heme oxigenase I (HO-1) na rota de apoptose.

Daniel Garcia dos Santos

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prf^o. Dr. José Artur Bogo Chies
Porto Alegre, Abril 2007

“No começo do Gênese, está escrito que Deus criou o homem para que ele reine sobre os pássaros, os peixes e os animais. É claro, o Gênese foi escrito por um homem e não por um cavalo. Nada nos garante que Deus quisesse realmente que o homem reinasse sobre as outras criaturas. É mais provável que o homem tenha inventado Deus para santificar o poder que ele usurpou sobre a vaca e o cavalo. O direito de matar um veado ou uma vaca é a única coisa sobre a qual a humanidade inteira manifesta acordo fraterno, mesmo durante as guerras mais sangrentas.”
(Insustentável leveza do ser – Milan Kundera)

Agradecimentos

Queria começar agradecendo ao meu orientador, José Artur Bogo Chies, mais conhecido por Zéca. Esse trabalho deve-se a confiança que ele sempre depositou em mim, e a todo seu apoio. Sinto-me um privilegiado de ter ele como meu orientador, mas acima de tudo, me permito dizer, que tenho ele como meu amigo. Admiro-o, e trabalho todos os dias procurando um dia me tornar não só o grande pesquisador que ele é, mas também o grande ser humano que ele é.

Um agradecimento especial ao meu co-orientador na prática, que só não é no papel devido as burocracias da UFRGS, Andrés Delgado Cañedo, a quem tenho como um grande amigo. Apesar de Argentino(brincadeira!!) ele é está sempre presente com uma ótima sugestão e todo o apoio de que precisamos nos difíceis momentos que enfrentamos ao longo do mestrado. A todo pessoal da Imunogenética, um laboratório de excelência e com pessoas excelentes, no qual trabalhar sempre nos rende muitas risadas.

A minha família, meus pais por todo o apoio, até porque entendo como muitas vezes seja difícil entender porque o filho “não começou a trabalhar ainda”. A meu irmão por sempre estar pronto para qualquer ajuda, sempre que preciso. Amo vocês e obrigado pela ajuda, apoio e carinho.

Aos amigos, presentes sempre em todos os momentos fazendo desses 2 anos bem mais fáceis. Ao Felipe, irmão de todas as horas, quase não tenho palavras para expressar tudo que ele significa na minha vida. Ao Gustavo, sempre com seu bom humor e um grande coração, e sempre proporcionando grandes duelos na sinuca e, é claro, só contribuíram p esses 2 anos de mestrado (hehehe). A Andréa Vargas, agora longe, ao menos temporariamente, alguém que mora no meu coração,e quem devo muito, por todo o apoio e palavras de conforto (e muitas risadas, Te adoro pequena!!!). A Priscila Viana, mineira, nem tenho como dizer como gosto dela e dizer como ela tornou esses 2 anos mais fáceis com toda sua espontaneidade e alegria, conquista a todos (Te adoro). A Adriana Giongo, nos conhecemos a um tempo relativamente curto, mas já a tempo suficiente para ela ter se tornado uma grande amiga, para todos os momentos, e com certeza uma das pessoas que mais me apoiou e emprestou seu ouvidos nos ultimos tempos (tu mora no meu coração, nunca vou esquecer toda essa amizade e apoio).

Bom talvez o número de linhas que reservei para essa pessoa não faça juízo a toda importância que ela tem na minha vida. Agradeço a Joséli, minha namorada e meu amor, estamos a 1 ano juntos, enfrentamos a distancia e agora estamos perto de ficarmos juntos outra vez. Muitos são os obstáculos meu amor, mas tão altos e desafiadores quanto os obstáculos é o amor que sinto por ti. O futuro é uma incógnita, mas quero que tu saiba que te amo, muito, muito mesmo.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	6
Lista de Figuras.....	7
Resumo.....	8
1.Introdução.....	9
1.1 Grupo Heme.....	9
1.2 Heme Oxigenase – Caracterização.....	11
1.3 Heme Oxigenase – Função Celular.....	14
1.4 Doenças relacionadas à HO-1.....	20
1.5 Aplicação anti-câncer da HO-1.....	22
1.6 HO-1 e Apoptose	23
2.Objetivos.....	27
2.1 Objetivos Gerais.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3.Materiais e Métodos.....	28
3.1 Cultivo das linhagens celulares U937 e Jurkat.....	28
3.2 Tratamentos.....	28
3.3 Determinação quantidade de óxido nítrico.....	29
3.4 Ensaio de atividade das caspases 3/7.....	30
3.5 PCR em tempo real.....	30
3.6 Viabilidade Celular.....	31
3.7 Análise Estatística.....	31
4.Resultados.....	32
4.1 Restrição de soro mais hemina determinam alta atividade de caspase 3/7, com envolvimento da enzima HO-1.....	32
4.2 Quantidades crescentes de hemina determinam comportamentos distintos em U937 e Jurkat.....	34
4.3 Óxido nítrico não está envolvido nas rotas determinadas pelos tratamentos que empregam restrição de soro, hemina e ZnPP.....	34

4.4 Relação de dose dependência entre quantidade de hemina e a quantidade de NO detectada nos tratamentos, sem envolvimento da HO-1.....	37
4.5 Viabilidade celular não é alterada pelos tratamentos com restrição de soro, hemina e ZnPP.....	37
4.6 Alterações na viabilidade celular são observadas apenas em altas quantidades de hemina.....	40
4.7 Análise da morfologia de Jurkat e U937 indicam alterações características de apoptose.....	40
4.8 Análise da expressão de HO-1 e iNOs indicam padrões opostos em U937 e Jurkat.....	43
5.Discussão.....	45
6.Conclusão.....	52
7.Bibliografia.....	54

Lista de Abreviaturas

AICD – Ativação Induzida de Morte Celular
AP-1 – Proteína Ativada 1
AP-2 – Proteína Ativada 2
Apo-E – Apolipoproteína E
BR – Bilirubina
BV – Biliverdina
c-AMP – Adenosina Monofosfato cíclica
cGMP – Guanosina 3,5-monofosfato cíclico
CO – Monóxido de Carbono
CORM-2 – Molécula Liberadora de CO
DOX – Doxiciclina
eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial
GTP – Guanosina Trifosfato
HO-1 – Heme Oxigenase I
HO-2 – Heme Oxigenase II
HO-3 – Heme Oxigenase III
HSE – Elemento Responsivo a Choque Térmico
ICAM-1 – Molécula de Adesão Intracelular 1
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 – Interleucina 10
IL-6 – Interleucina 6
iNOS – Óxido Nítrico Sintase indutível
IRP – Proteína Regulada por Ferro
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
LMC – Leucemia Mielóide Crônica
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK – Proteína cinase ativadora de mitose
MRE – Elemento Responsivo a Metal
Nf- κ B – Fator Nuclear κ B
nNOS – Óxido Nítrico Sintase neuronal
NOS2 – Óxido Nítrico Sintase indutível
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
SFB – Soro Fetal Bovino
sGC – Guanilato Ciclase solúvel
TGF- β – Fator de Transformação e Crescimento β
TNF- α – Fator de transformação nuclear α
U.V. – Ultra Violeta
ZnPP – Zinco II Protoporfirina IX

Lista de Figuras

- a) *Figura 1* - Rota de degradação do grupo heme catalisada pela HO1(pág 12);
- b) *Figura 2* - Atividade de caspase 3/7 detectada nos tratamentos empregando restrição de soro (0.2%), hemina (20 μ M) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10 μ M)(pág 33);
- c) *Figura 3* - Atividade de caspase 3/7 detectada nos tratamentos empregando quantidades crescentes de hemina (12.5, 25, 50, 100 e 200 μ M) e o inibidor zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10 μ M)(pág 35);
- d) *Figura 4* - Quantidade de nitrito detectado nos sobrenadantes através do ensaio de Griess, nos tratamentos empregando restrição de soro (0.2%), hemina (20 μ M) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10 μ M)(pág 36);
- e) *Figura 5* - Quantidade de nitrito detectado nos sobrenadantes através do ensaio de Griess, nos tratamentos empregando quantidades crescentes de hemina (10, 20, 50 100, 200 e 400 μ M) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10 μ M)(pág 38);
- f) *Figura 6* - Viabilidade celular avaliada através de citometria de fluxo, empregando iodeto de propídeo, nos tratamentos empregando restrição de soro (0.2%), hemina (20 μ M) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10 μ M)(pág 39);
- g) *Figura 7* - Viabilidade celular avaliada através de citometria de fluxo, empregando iodeto de propídeo, nos tratamentos empregando quantidades crescentes de hemina (10, 20, 50 100, 200 e 400 μ M) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10 μ M)(pág 41);
- h) *Figuras 8 e 9* – Análise da viabilidade e morfologia celular das linhagens U937 e Jurkat(pág 42);
- i) *Figura 10* - Avaliação da quantidade de transcritos de HO-1 e iNOS, em quantidades crescentes de hemina (10, 20, 50 e 100 μ M), após 24h de tratamento, através da PCR em tempo real(pág 44).

Resumo

As heme oxigenases catalisam a degradação do grupo heme produzindo bileverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro. A heme oxigenase I (HO-1) é a isoforma indutível e está dentro do grupo das proteínas de choque térmico. A expressão dessa enzima é desencadeada como resultado de diversos estímulos de estresse. Evidências presentes na literatura sugerem um papel fundamental da HO-1 no crescimento e morte celular. Apesar da maioria das evidências confirmarem o efeito citoprotetivo (anti-apoptótico) da HO-1, ainda existem muitas controvérsias a esse respeito. Já foi demonstrado que a HO-1 pode exercer diferentes efeitos na sobrevivência celular incluindo a indução de apoptose, dependente dos níveis de expressão da enzima bem como do tipo celular. A linhagem celular pré-monocítica, U937, e a linhagem celular linfoblástica, Jurkat, foram submetidas a restrição de soro mais hemina 20 μ M (grupo heme oxidado, indutor de HO-1), durante diferentes tempos, e a quantidades crescentes de hemina durante 24h sem restrição de soro. Após 12h, ambas as linhagens celulares demonstraram, no tratamento envolvendo restrição de soro mais hemina, um aumento significativo ($p < 0,001$) na atividade de caspase 3/7 (U937, 135 pmol/min/mg proteína, e Jurkat, 384 pmol/min/mg proteína) quando comparado aos controles. A adição do inibidor específico de HO-1, zinco II protoporfirina IX (ZnPP), resultou em uma diminuição significativa ($p < 0,001$) na atividade de caspase 3/7 (U937, 70 pmol/min/mg proteína, and Jurkat, 150 pmol/min/mg proteína), demonstrando um papel ativo da HO-1 na apoptose induzida pelo tratamento que empregou restrição de soro mais hemina. As linhagens celulares mostraram comportamentos distintos quando tratadas com quantidades crescentes de hemina, de forma que não se atingiu a super-expressão da enzima HO-1. A linhagem celular Jurkat apresentou uma regulação negativa na expressão de HO-1 em quantidades crescentes de hemina, resultado esse sem precedentes na literatura, indicando uma regulação diferenciada dessa enzima nessa linhagem celular. Esses resultados indicam que a atividade de HO-1 é importante para manter os altos níveis de caspase 3/7. Portanto, no sistema de estresse gerado pela restrição de soro mais hemina, a HO-1 estaria agindo como um regulador positivo da apoptose.

1. Introdução

1.1 Grupo Heme

A molécula heme promove muitos processos oxidativos, os quais são vitais para as funções celulares e para a manutenção da homeostase do organismo. Heme está envolvida na síntese de proteínas responsáveis pelo transporte de oxigênio, na respiração mitocondrial, no metabolismo de drogas, na biossíntese de esteróides, nas defesas celulares antioxidantes e em processos de transdução de sinal (Maines, 1992). A molécula heme está presente em diferentes células e tecidos desempenhando diversas funções essenciais para o organismo. As células eritróides sintetizam o grupo heme exclusivamente para sua incorporação na hemoglobina. No músculo, predomina a mioglobina, que é empregada para estocar oxigênio. Todos os tecidos que realizam respiração necessitam do grupo heme para os citocromos (Maines, 1992; Schacter, 1988; Anderson, 1996; Moore, 1998). Além disso, o grupo heme participa do domínio catalítico das enzimas do grupo das monoxigenases (por exemplo, a família da citocromo P-450) (Bonkovsky, 1990). São exemplos de hemoproteínas as enzimas antioxidantes como catalase e as peroxidases não-específicas (lactoperoxidase e cloroperoxidase). O grupo heme ocorre também em proteínas responsáveis pela transdução de sinal, tais como as óxido nítrico sintases (endotelial eNOS, neuronal nNOS e indutível iNOS) e guanilato ciclase solúvel (sGC) (White and Marletta, 1992; Ignarro *et al.*, 1984).

As rotas de síntese e degradação do grupo heme afetam o metabolismo oxidativo uma vez que ambas estão estreitamente relacionadas com o ciclo celular do ferro. A função determinante na quebra dos grupos heme é desempenhada pela enzima heme oxigenase 1 (HO-1). Essa enzima tem emergido como um componente central na resposta a estresse em mamíferos, uma vez que o gene que a codifica pode ser induzido tanto por estímulos químicos quanto físicos (Maines, 1992; Kikuchi and Yoshida, 1983; Schacter, 1988; Abraham *et al.*, 1988; Ryter and Tyrrell, 1997).

A maioria dos grupos heme existentes no organismo de um mamífero é utilizada para o transporte de oxigênio na proteína hemoglobina. O destino do grupo heme presente na

hemoglobina é bem definido: é sintetizado nos eritrócitos e degradado no sistema reticuloendotelial. A hemoglobina presente nas células vermelhas intactas, mas senescentes, sofre degradação no sistema reticuloendotelial do fígado, do rim e principalmente do baço, onde a atividade da HO-1 é alta. A hemoglobina livre e o grupo heme liberados podem então entrar na circulação sanguínea durante a hemólise. O heme liberado circula no sangue complexado a proteínas do soro (hemopexina e albumina), enquanto as formas livres de hemoglobina formam complexos com a haptoglobina. As cadeias de hemoglobina e grupo heme são então ligadas e importadas para o parênquima do fígado através de endocitose mediada por receptor, sendo sua degradação realizada pela HO-1 (Ryter and Tyrrell, 2000).

O grupo heme, quando livre, pode promover reações dependentes de ferro que podem ser deletérias para o organismo, uma vez que geram espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou promovem a peroxidação de lipídeos de membrana, os quais podem levar ao rompimento das membranas celulares. O grupo heme é hidrofóbico e pode facilmente entrar nas membranas celulares, agindo então como um catalisador para a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e gerando produtos que são tóxicos para o endotélio (Balla *et al.*, 1991; Miller and Shaklai, 1994; Camejo *et al.*, 1998). Os efeitos tóxicos do grupo heme livre são importantes em uma série de patologias, particularmente em condições agudas como a hemólise intravascular (a qual pode resultar em falha renal), e em processos mais freqüentes, como a aterogênese, no qual depósitos de ferro dentro das lesões podem ser observados (Hunter *et al.*, 1991; Jeney *et al.*, 2002). Em condições fisiológicas normais o *pool* de heme livre é reduzido (0.1-0.2 μ M no fígado) (Granick *et al.*, 1975). Esse *pool* é resultado tanto dos novos grupos heme sintetizados com o objetivo de serem incorporados nas hemoproteínas que existe transientemente na forma de grupos heme livres, quanto o grupo heme liberado durante o *turnover* natural, ou farmacologicamente induzido, das hemoproteínas o qual também existe transientemente como heme livre antes de sua degradação pela HO. Esse *pool* seria também a fonte de grupos heme a serem reutilizados pela célula. Dessa forma, o *pool* de heme livre pode aumentar, por exemplo, em situações em que se acelera o *turnover* das hemoproteínas. Considera-se, assim, que situações de estresse oxidativo podem modificar a estrutura de proteínas, causando fragmentação, interligação, mudanças de carga, hidrofobicidade e solubilidade (Neuzil *et al.*, 1993; Davies and Delsignore, 1986). Tais modificações se

ocorrerem em uma hemoproteína, podem levar à liberação do grupo heme. Como o grupo heme em sua forma livre é potencialmente tóxico para a célula, sua concentração deve ser controlada para a manutenção da homeostase celular. Sendo assim, a indução da HO-1 seria uma estratégia para degradar o grupo heme liberado das hemoproteínas intracelulares em condições de estresse oxidativo, a fim de compensar o aumento transiente da quantidade de heme livre necessária para síntese de hemoproteínas, prevenindo assim a acumulação de heme nas membranas (Ryter and Tyrrell, 2000).

1.2 Heme Oxigenase – Caracterização

A heme oxigenase é uma enzima envolvida na degradação de grupos heme. A clivagem oxidativa do grupo resulta na formação de monóxido de carbono (CO), Fe^{+2} e biliverdina (BV), sendo essa última subsequentemente convertida em bilirubina (BR) citosólica através da ação da enzima biliverdina redutase (fig. 1) (Maines, 1988; Shibahara, 1988).

Três isoformas da HO já foram identificadas em mamíferos: HO-1, HO-2 e HO-3 (Maines, 1988; Shibahara, 1988; McCoubrey *et al.*, 1997). As três enzimas são produtos de diferentes genes, e seus padrões de expressão variam amplamente entre diferentes tipos celulares e tecidos. As heme oxigenases estão ancoradas no retículo endoplasmático por uma seqüência hidrofóbica de aminoácidos localizada na extremidade carboxi-terminal da proteína. HO-1 e HO-2 apresentam uma pequena similaridade na seqüência de aminoácidos (40%), no entanto, HO-2 e HO-3 apresentam maior grau de homologia (90%). As três isoformas são altamente conservadas ao longo da evolução e são expressas em virtualmente todas as formas de vida (bactérias, fungos, plantas e humanos), regulando uma grande variedade de processos celulares (Terry *et al.*, 2002). A homologia das proteínas HO-1 e HO-2 entre ratos, camundongos e humanos é alta, 80% e 90%, respectivamente.

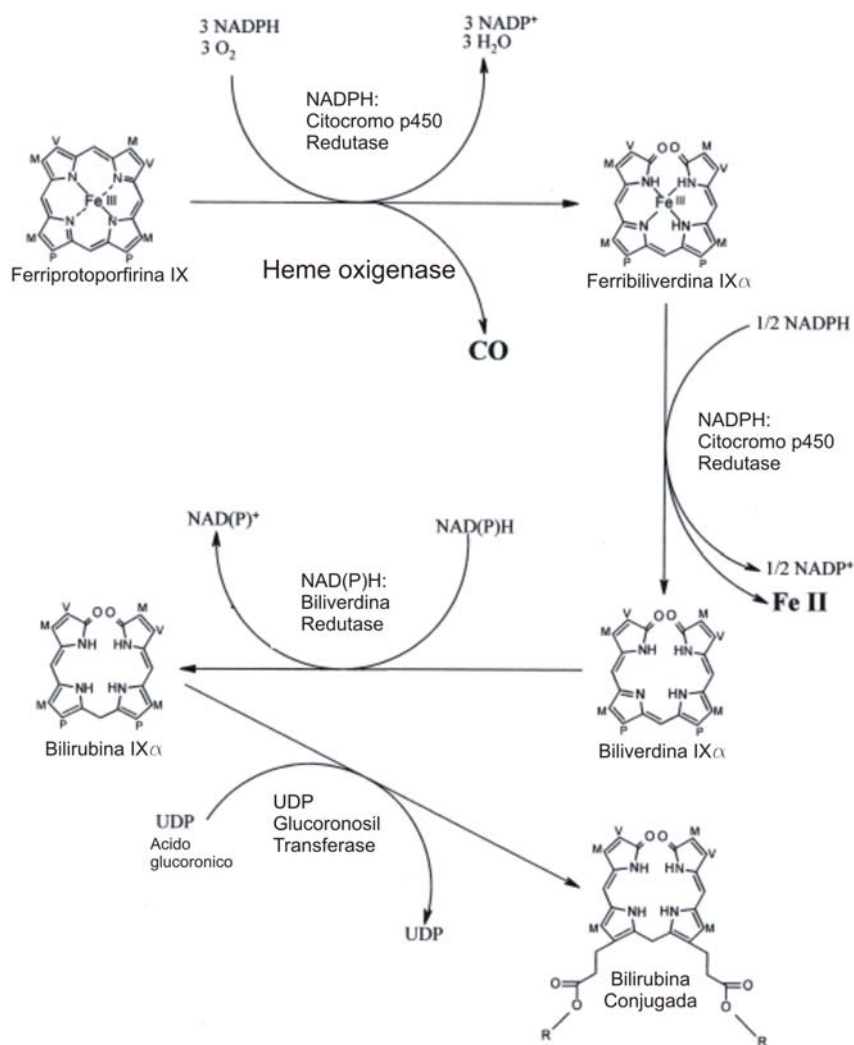


Figura 1 – Rota de degradação do grupo heme catalisada pela HO1. Adaptado de Ryter and Tyrrell, 2000).

Em condições fisiológicas normais, a maioria das células expressa níveis baixos ou indetectáveis de HO-1. Por outro lado, HO-2 encontra-se expressa constitutivamente, e a expressão de HO-3 necessita ainda de maior caracterização. Os níveis transcricionais de HO-2 são regulados positivamente apenas como resultado da ação de poucos agentes, como opiatos e glicocorticóides adrenais (Li and David Clark, 2000; Liu *et al.*, 2000).

HO-1 é a isoforma indutível, apresentando 32 KDa. A HO-1 está dentro do grupo das proteínas de choque térmico (*heat shock protein, HSP32*), e sua expressão é desencadeada

como resultado de diversos estímulos de estresse, entre eles hipóxia, metais pesados, radiação UV, ROS (como peróxido de hidrogênio - H_2O_2) e espécies reativas de nitrogênio como óxido nítrico (NO) (Motterlini *et al.*, 2000; Mitani *et al.*, 1993; Keyse and Tyrrell, 1989; Hara *et al.*, 1999; Hartsfield *et al.*, 1997; Dóí *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2003; Zamora *et al.*, 2002). Entre os elementos que regulam negativamente HO-1 estão *scavengers* de ROS, como a *N*-acetilcisteína que reduz a magnitude da indução de HO-1 através de estresse oxidativo (Lautier *et al.*, 1992). Além disso, tem sido mostrado que a expressão do gene da HO-1 pode ser regulada negativamente pela angiotensina II, através de uma sinalização mediada por cálcio (Ishizaka and Griendling, 1997), interferon- γ (Takahashi *et al.*, 1999), prostaglandina E2 (Tetsuka *et al.*, 1995), TGF- β (*transforming growth factor-B*) (Pellacani *et al.*, 1998), e interleucina 10 (IL-10) (Immenschuh *et al.*, 1999).

A região promotora da HO-1 tem sido estudada em busca de possíveis elementos regulatórios que possam ser alvo de fatores específicos induzidos em diferentes situações de estresse celular. Sítios funcionais de ligação a AP-1 (*Activating Protein-1*) foram identificados, sugerindo envolvimento da família de fatores de transcrição Jun/Fos na indução da transcrição do gene HO-1 em resposta a múltiplos agentes (Alam and Den, 1992). Outros fatores de transcrição podem estar envolvidos na indução de HO-1, como indicado pela presença de elementos conservados MREs (*Metal Response Elements*) e HSEs (*Heat Shock Elements*) nos promotores de genes HO-1 de diferentes espécies. Dois elementos responsivos à interleucina 6 (IL6) foram encontrados na região promotora do gene da HO-1 humana (Mitani *et al.*, 1992). A diversidade dos indutores de HO-1 sugere múltiplos elementos regulatórios para esse gene. Sítios de ligação para NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) e AP-2 (*Activating Protein-2*) foram também identificados, estando esses fatores implicados no papel da HO na resposta a processos de estresse oxidativo/dano e crescimento/diferenciação (Lavrovsky *et al.*, 1994). Sítios de ligação a AP-2 têm sido identificados em regiões reforçadoras de genes virais e celulares. Forbol éster, cAMP (AMP-cíclico) e ácido retinóico têm sido mostrados como indutores de AP-2, o qual acredita-se ter um papel importante na regulação de genes envolvidos na diferenciação celular (Imagawa *et al.*, 1987; Luscher *et al.*, 1989; Mitchell *et al.*, 1991; Snape *et al.*, 1991). NF- κ B é um fator de transcrição presente em diferentes tipos celulares e que responde a estímulos patogênicos primários (vírus, bactérias e

fatores de estresse) e secundários (citocinas inflamatórias) (Nolan *et al.*, 1993; Gerritsen and Bloor, 1993; Grimm and Baeuerle, 1993; Liou and Baltimore, 1993; Beg *et al.*, 1993). O fator ativado conduz a rápida indução de genes que codificam proteínas de defesa e sinalização, colocando o NF- κ B como um mediador inicial da resposta imune e inflamatória. Além disso, mostrou-se uma maior expressão da HO-1 como um efeito compensatório em resposta ao aumento do estresse oxidativo durante o envelhecimento, sendo essa rota de ativação mediada por NF- κ B (Lavrovsky *et al.*, 2000).

HO-1 é ativa mesmo em baixas concentrações de substrato, e sua atividade aumenta com o aumento da concentração de heme, dentro de uma variação fisiológica. Por outro lado, a HO-2 tem uma baixa atividade em baixas concentrações de substrato, e mesmo sua máxima atividade é limitada a menos que 10% da atividade da HO-1 (Maines and Panahian, 2001). As heme oxigenases tem alta atividade no baço, testículo e cérebro. O baço é o único órgão no qual, em condições onde não há estresse, HO-1 é a forma predominante. HO-2 é abundante no cérebro, testículo e fígado. HO-3 foi identificada no cérebro, rim, fígado, coração, testículo e baço, mas com uma pobre capacidade de degradação de grupo heme (McCoubrey *et al.*, 1997). Em razão da sua capacidade de ligação a heme, HO-2 e HO-3 podem funcionar como a primeira frente de combate para o controle da acumulação inicial do grupo heme livre.

1.3 Heme Oxigenase – Função Celular

As funções biológicas da heme oxigenase estão associadas com a resposta celular a diferentes tipos de estresse (Stocker, 1990; Willis *et al.*, 1996; Siow *et al.*, 1999). Muitas evidências indicam um papel vital da HO-1, tanto no crescimento quanto na morte celular, principalmente através de seu envolvimento na regulação da apoptose (Tanaka *et al.*, 2003). A HO-1 estimula o crescimento celular e a proliferação de vários tipos celulares, o que pôde ser evidenciado pelo fato que a administração de seu inibidor anula totalmente o efeito proliferativo (Clark *et al.*, 1997). Existe também indicação de envolvimento da HO-1 em angiogênese (Deramaudt *et al.*, 1998), reforçando ainda mais seu papel proliferativo. A HO-1 é amplamente expressa em células tumorais, incluindo adenocarcinoma, hepatoma, sarcoma, glioblastoma e melanoma (Doi *et al.*, 1999; Goodman *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1999; Deininger

et al., 2000; Torisu-Itakura *et al.*, 2000), as quais possuem alta capacidade proliferativa. A expressão dessa enzima parece sustentar também o crescimento celular. Evidências indicam que tal fato só é possível visto que o crescimento é um balanço entre a proliferação e a morte celular. Logo, como a HO-1 está em estreito contato com a rota que determina a apoptose, sua regulação pode ser a chave para a determinação da acentuada proliferação (Fang *et al.*, 2004).

A capacidade antioxidante da HO-1 é muito discutida, mas seu envolvimento em contextos inflamatórios já está bem estabelecido na literatura. Demonstrou-se, por exemplo, a relação da HO-1 com a interleucina 10 (IL-10). Essa citocina é conhecida por sua capacidade de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6, IL-1, fator estimulador de colônia granulócito/macrófago, e induzir a geração de óxido nítrico por monócitos/macrófagos ativados por lipopolissacarídeos (LPS). A IL-10 induziria, então, a expressão de HO-1 através de uma rota dependente da proteína quinase p38, conforme demonstrado em macrófagos de origem murina (Lee and Lee-Young, 2002). A ativação dessa rota teria como resultado a proteção contra choque-séptico resultado do estímulo dos macrófagos com LPS. Além disso, constatou-se que quando o CO é seqüestrado do meio, os efeitos na redução da produção de TNF- α e NO através do estímulo com LPS foram diminuídos. Isto indica que a IL-10 depende da HO-1 para seu efeito anti-inflamatório, e que entre os produtos da reação da HO-1, o CO seria aquele com o papel mais ativo nesse processo (Lee and Lee-Young, 2002). Outro estudo demonstrou que a transferência do gene da IL-10, empregando um vetor viral adeno-associado, em ratos, diminui a rejeição vascular nos transplantes através de um mecanismo envolvendo a HO-1, destacando-se o fato que a inibição da enzima levou a um aumento da rejeição mesmo com a transferência do gene da IL-10 (Chen *et al.*, 2005). Observou-se também a capacidade da HO-1 em bloquear a maturação de células dendríticas e em inibir respostas imunes pró-inflamatórias e alogênicas, mantendo-se os níveis de IL-10, o que atribuiu à HO-1 uma nova função dentro do sistema imunológico (Chauveau *et al.*, 2005).

A HO-1 é regulada positivamente por uma ampla variedade de sinais de estresse. Tal fato ilustra as diferentes faces da molécula heme na inflamação; pequenas concentrações de heme podem agir de forma citoprotetiva através de uma regulação positiva da HO-1 (Maines, 1997; Hayashi *et al.*, 1999) ao passo que grandes quantidades de heme podem agir de forma

deletéria para o tecido através de efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios (Nath *et al.*, 2001; Wagener *et al.*, 2001). Tais efeitos deletérios acabam não sendo neutralizados pelas propriedades anti-oxidativas e anti-inflamatórias da HO-1, bem como dos produtos da sua reação. A produção de HO-1 é elevada em células inflamatórias durante a fase de resolução da inflamação (Willis *et al.*, 1996). Foi demonstrado recentemente que a IL-10 promove muito dos seus efeitos anti-inflamatórios através da regulação positiva da HO-1 (Lee and Chau, 2002). A indução da HO-1 gera uma significativa supressão da inflamação, no entanto, a inibição da enzima potencializa a resposta inflamatória em diferentes modelos de inflamação (Amersi *et al.*, 1999; Nath, 1999; Vogt *et al.*, 1996; Agarwal and Nick, 2000; Willis *et al.*, 2000; Wagener *et al.*, 2001).

Os exemplos da ação da HO-1 não se limitam apenas a situações que envolvem IL-10. A prostoglandina 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ que possui um potente efeito anti-inflamatório através da inibição direta do fator nuclear NF- κ B, suprimindo a produção de TNF- α e NO em macrófagos murinos estimulados por LPS, tem seu efeito significativamente atenuado com a inibição da HO-1 ou com a retirada do CO do meio (Lee *et al.*, 2003). Fica clara então a importância da HO-1 em contextos que envolvem alto estresse celular, como é o caso das situações de inflamação.

Os efeitos citoprotetivos da HO estão sendo relacionados também à sua capacidade de modular negativamente a expressão de moléculas de adesão. As moléculas de adesão são importantes no recrutamento de células inflamatórias para os locais de inflamação crônica e aguda, e, portanto, cruciais na determinação do andamento do processo inflamatório (Behrend, 2000). Essa hipótese é apoiada por observações que indicam que a expressão elevada de HO-1 reduz a expressão de ICAM-1 (induzida por grupo heme). No entanto, inibição da atividade da HO aumenta a expressão de ICAM-1 e o influxo de leucócitos (Wagener *et al.*, 1999; Wagener *et al.*, 2001).

Os produtos originados da quebra do grupo heme pela HO-1 são CO, ferro e biliverdina (que é convertida em bilirubina). Como podemos constatar, de acordo com os exemplos já citados, o CO surge como um dos principais efetores das funções protetivas e anti-inflamatórias desempenhadas pela HO-1. No entanto, muita controvérsia existe a este respeito.

Experimentos envolvendo transplantes cardíacos em camundongos e ratos demonstraram que a expressão de HO-1 pelo sistema vascular do enxerto é crítica para se obter a sobrevivência do mesmo. Nesse contexto, observou-se que a inibição da HO-1 resulta na rejeição do enxerto em um prazo de 3-7 dias. A rejeição foi associada com uma ampla agregação plaquetária, trombose das arteríolas coronárias, infarto do miocárdio, e apoptose tanto das células do miocárdio, como de células endoteliais. Mantendo a HO-1 inibida e fornecendo CO, suprimiu-se a rejeição do enxerto, restaurando sua longa sobrevivência. Esse efeito do CO foi associado com a inibição da agregação plaquetária e a proteção das células endoteliais contra apoptose (Sato *et al.*, 2000). Recentemente, demonstrou-se também que o CO possui um potente efeito anti-proliferativo em células musculares lisas vasculares e em células das vias aéreas, de forma dependente das rotas de sinalização de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e cGMP (guanosina 3,5-monofosfato cíclico ou GMP-cíclico) (Song *et al.*, 2002; Otterbein *et al.*, 2003). Em outro estudo, CO inibiu a proliferação de linfócitos T ativados, através de uma rota independente de MAPK e cGMP. Com a inibição das caspase-3 e caspase-8, mostrou-se que somente com a inibição da caspase-8 houve uma diminuição no efeito antiproliferativo do CO, o que evidencia uma dependência de CO em relação à caspase-8 para suprimir a proliferação (Song *et al.*, 2004).

O CO divide com a molécula de NO a capacidade de ativar a proteína guanilil ciclase pela ligação ao grupo heme presente em seu centro catalítico. Essa ligação resulta no aumento da conversão da guanosina trifosfato (GTP) em cGMP e subsequente vasodilatação. No entanto, CO, ao contrário do NO, não contém elétrons livres, sendo, portanto, relativamente inerte (Marks *et al.*, 1991; Morita and Kourembanas, 1995; Maines *et al.*, 1991). CO pode ativar o sistema deste segundo mensageiro (cGMP) e mediar numerosos processos fisiológicos, como a atividade de proteína quinases, canais iônicos e fosfodiesterases (Maines, 1997). CO age de forma similar ao NO, no entanto, possui funções adicionais em rotas de transdução de sinal. CO inibe genes pró-inflamatórios enquanto aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias através da ativação seletiva de rotas que envolvem p38 MAPK, de uma forma independente de cGMP (Brouard *et al.*, 2000; Otterbein *et al.*, 2000; Sarady *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2003).

Por outro lado, classicamente atribui-se ao ferro originado da degradação do grupo heme um papel antioxidante, uma vez que ele estimularia a expressão da proteína ferritina, responsável por estocar o ferro celular, não permitindo assim que o mesmo fique disponível para participar das reações oxidativas danosas à célula. Essa regulação ocorreria em nível de mRNA, onde uma proteína regulatória (IRP) se ligaria ao mRNA da ferritina inibindo sua tradução. Quando houvesse ferro disponível no citoplasma, esse ferro se ligaria à IRP, liberando Fe-IRP do mRNA da ferritina e desreprimindo sua tradução (Eisenstein and Munro, 1990).

No entanto, no trabalho de Ferris *et al.*, (1999), viu-se que, quando da deleção do gene da HO-1, ocorre acentuada morte de fibroblastos de origem murina, em situações de ausência de soro no meio de cultura, sendo esse efeito revertido quando empregou-se células super-expressando HO-1. O mais importante nesse estudo foi a constatação de um acúmulo de ferro nas células deficientes em HO-1 quando comparadas com as células que super-expressavam HO-1, observando-se também um aumento do efluxo de ferro nas células que super-expressavam HO-1. Nas células deficientes em HO-1, com menor efluxo de ferro, o emprego de quelantes de ferro reverteu o quadro de morte celular. Quando foi empregado 8-bromo cGMP, com o objetivo de mimetizar a produção de CO, ou bilirubina, não houve diminuição na morte celular das células deficientes para HO-1 em ausência de soro. Não foi constatada diferença na expressão de ferritina entre os diferentes tratamentos, indicando que as reservas de ferro não são reguladas por HO-1 nas células empregadas nesse estudo. Em outro estudo, camundongos nocaute para o gene da HO-1 desenvolveram anemia associada com níveis baixos de ferro no soro, com acumulação renal e hepática de ferro que contribuiu para dano oxidativo macromolecular, dano no tecido e inflamação crônica. Tais resultados indicam que a HO-1 tem um importante papel na reciclagem de ferro facilitando sua liberação das células hepáticas e renais (Poss and Tonegawa, 1997).

Foi proposto também um papel antioxidante da HO, através da produção dos pigmentos da bile, BV, e o seu metabólito BR (Stocker, 1990). Entre as características antioxidantes de BV e BR estão a prevenção da oxidação de ácidos graxos polinsaturados. A BR funciona como redutora de radicais peroxil, e também quando complexada a albumina (como é encontrada no sangue) previne a peroxidação da albumina. A albumina está ligada a

ácidos graxos e acaba também protegida da degradação mediada pela ação de radicais superóxido (Stocker *et al.*, 1987a; Neuzil and Stocker, 1993; Stocker and Ames, 1987b; Stocker and Peterhans, 1989a; Neuzil and Stocker, 1994; Stocker and Peterhans, 1989b). Existem poucas evidências que sugerem que a BR seja seletivamente retida no plasma ou nas membranas intracelulares para servir como antioxidante de membranas. As evidências experimentais dessas propriedades antioxidantes vêm em sua maioria de estudos *in vitro*. O excesso e o acúmulo de BR não conjugada no plasma leva à ocorrência de icterícia em recém-nascidos e altas concentrações desse metabólito podem conduzir ao desenvolvimento de encefalopatia. No entanto, o exato mecanismo pelo qual BR leva à neurotoxicidade é desconhecido (Ryter and Tyrrell, 2000).

Como pode-se observar, os produtos da reação da HO-1 possuem múltiplos efeitos na homeostase celular. Destacar um desses produtos como o principal efector das funções desempenhadas pela HO-1 dentro do organismo é uma missão difícil. No entanto, não podemos deixar de vislumbrar a possibilidade de que, dependendo do tipo celular, haverá um produto com maior importância, ou até mesmo que esses três produtos produzam efeito sinérgico, somando suas capacidades antioxidantes, e colocando a HO-1 em uma posição central dentro das rotas celulares que determinam a sobrevivência celular diante de diferentes tipos de estresse oxidativo.

As inúmeras evidências do papel protetivo da HO-1 até então citadas podem ser resumidas em uma circunstância fundamental da atividade dessa enzima: sua ação sobre o processo de apoptose, ou mais especificamente seu poder anti-apoptótico. Os efeitos dessa enzima sobre a rota apoptótica são diversos e também controversos. Como já citado anteriormente (Song *et al.*, 2004), mostrou-se que CO diminui a proliferação de linfócitos T, inibindo as caspases 3 e 8 (proteínas fundamentais no processo apoptótico). No entanto, em monócitos colocados em meio com menor quantidade de soro observou-se a indução de apoptose. Esse efeito foi inibido pela ativação da enzima HO-1, através do tratamento com hemina. Nessa situação, apesar do efeito anti-apoptótico da HO-1, constatou-se uma ativação de caspase 3 (Lang *et al.*, 2004). Fica então a necessidade de maiores estudos sobre os efeitos diretos da expressão da enzima HO-1 sobre as moléculas efectoras do processo de apoptose, a fim de esclarecer se realmente existe um efeito direto dessa enzima. Por outro lado, a

capacidade anti-apoptótica da HO-1 poderia ser resultado de um efeito indireto no qual o potencial anti-oxidante da mesma neutralizaria possíveis agentes estressantes que desencadeariam a morte celular programada.

Apesar dos inúmeros estudos que sugerem um papel fundamental protetor da HO-1 (anti-apoptótico), existem registros na literatura que indicam a existência também de um efeito contrário (pró-apoptótico). Tais resultados foram obtidos em experimentos em que alta expressão de HO-1 transfectada, em músculo liso, disparou a apoptose celular tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo que a HO-1 modula seu papel na sobrevivência celular dependendo do nível de expressão (Tulis *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002). Resultados semelhantes também foram obtidos em macrófagos murinos, onde o tratamento com morfina levou a uma acentuada morte celular mediada por ativação de HO-1 (Patel *et al.*, 2003). No entanto, pouco se sabe a respeito desse efeito pró-apoptótico da HO-1, ficando a necessidade de maiores estudos a fim de esclarecer as rotas envolvidas e identificar possíveis aplicações para esse processo.

1.4 Doenças relacionadas à HO-1

A importância da enzima HO-1 em diferentes aspectos da fisiologia do organismo fica ainda mais evidente quando se destaca o seu envolvimento com a etiologia das mais diferentes doenças, onde sua ativação aparece como uma abordagem clínica promissora.

A expressão de HO-1 em casos de arteriosclerose é protetiva. A abundância de HO-1 (mRNA e proteína) tem sido identificada em placas arterioscleróticas humanas. A expressão aumentada de HO-1 é observada em lesões avançadas de animais modelo para arteriosclerose (Wang *et al.*, 1998). A super-expressão da HO-1 em camundongos deficientes para apolipoproteína E (apo-E) atenuou o desenvolvimento de arteriosclerose (Juan *et al.*, 2001).

Muitas linhas de evidências sugerem que a regulação positiva de HO-1 pode ser um importante fator protetivo após angioplastia em doenças cardiovasculares como restenose vascular (Ishilawa, 2003; Schillinger *et al.*, 2004). Estudos estão se concentrando na região de repetição (GT)_n localizada na região proximal do promotor da HO-1 humana, em estreita relação com a restenose vascular. Um estudo investigando a associação de um polimorfismo de tamanho do promotor da HO-1 humana e restenose vascular periférica mostrou níveis

significativamente reduzidos de inflamação em pacientes, submetidos à angioplastia, com repetições curtas (GT)n (<25) quando comparado a pacientes com repetições longas (Schillinger *et al.*, 2004; Exner *et al.*, 2004). Esses resultados são confirmados em restenose arterial coronária onde portadores de repetições longas (GT)n possuem 3,74 vezes mais risco de desenvolver a doença quando comparados com portadores de repetições curtas (Deshane *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo endotelial tem um papel importante na fisiologia da pré-eclâmpsia, uma desordem hipertensiva da gravidez (Lum and Roebuck, 2001). Processos inflamatórios críticos como aumento da interação leucócito-endotélio associado à regulação positiva de moléculas de adesão e permeabilidade endotelial a espécies reativas de oxigênio estão envolvidos no desenvolvimento dessa condição. A HO-1 parece estar envolvida com esse processo. Em um estudo investigando o efeito da ativação de HO-1 em dano placentar induzido por TNF- α e circulação feto-placentar, a indução de HO-1 significativamente atenuou a resposta inflamatória responsável pelo dano (Ahmed *et al.*, 2000).

Já no contexto da hipertensão foi demonstrado que ratos sensíveis a sal (*Dahl rats*, DS) tem a expressão de HO-1 arterial coronária aumentada com hipertensão induzida por sal, e a cardioproteção foi provida promovendo vasodilatação coronária provavelmente através da geração de CO (Johnson *et al.*, 2004).

Em pacientes com diabetes, complicações cardiovasculares são resultado da geração de ROS, especificamente superóxido (Giugliano *et al.*, 1995). A hiperglicemia é responsável pela disfunção endotelial, pelo atraso na replicação e pelo aumento na apoptose (Zou *et al.*, 2002). Esses eventos parecem ser reversíveis mediante a expressão de uma enzima anti-oxidante, como HO-1. Foi mostrado que a diabetes induz um aumento do estresse oxidativo e resulta na regulação positiva da HO-1 no fígado (Cosso *et al.*, 2001). A expressão acentuada de HO-1 em ratos diabéticos resultou em um aumento de bilirubina no soro, reduziu a produção de ROS e atenuou a injúria nas células endoteliais (Abraham *et al.*, 2004).

Evidências recentes indicam que prolongada expressão de HO-1 em células gliais humanas que haviam sofrido infarto cerebral focal e dano traumático ajudou na recuperação do tecido neuronal após esses insultos (Beschoner *et al.*, 2000). Por outro lado, tratamento com o inibidor de HO-1 (zinco protoporfirina, ZnPP) antes da isquemia reduziu o tamanho do

enfarto e edema (Kadoya *et al.*, 1995). Muita contradição ainda existe nessa área e maiores estudos são necessários.

Fica claro, através desses exemplos, a grande importância da HO-1, principalmente através de seu papel protetivo, em mecanismos de defesa celular. Ampliar ainda mais esses estudos é cada vez mais importante, procurando explorar aplicações terapêuticas para essa enzima, e abordando diferentes rotas que possam estar envolvidas tanto no contexto antiapoptótico (anti-oxidante) quanto pró-apoptótico.

1.5 Aplicação anti-câncer da HO-1

Pelo alto poder citoprotetivo da HO-1, tem sido sugerida uma aplicação dessa enzima em várias doenças, incluindo arterioesclerose (Siow *et al.*, 1999), hipertensão (Ishizaka *et al.*, 1997), dano agudo renal (Nath *et al.*, 1992), nefropatia tóxica (Agarwal *et al.*, 1995), rejeição de transplantes (Sato *et al.*, 2001), choque endotóxico (Lee and Chau, 2002), doença pulmonar obstrutiva crônica (Yamada *et al.*, 2000), doença de Alzheimer (Guo *et al.*, 2001). No caso de choque endotóxico, o emprego do inibidor específico dessa enzima (ZnPP) resultou em uma piora do quadro geral da doença (Lee and Chau, 2002), e o contrário ocorre quando do emprego de ativadores da mesma (Agarwal *et al.*, 1995).

Também se sabe que ocorre a expressão de altos níveis de HO-1 em vários tumores, como por exemplo no caso de carcinoma (Goodman *et al.*, 1997). A HO-1 desempenha então uma importante função no rápido crescimento do tumor através de seus efeitos antioxidantes e anti-apoptóticos (Tanaka *et al.*, 2003; Zamora *et al.*, 2002). Dentro desse contexto, surge uma nova abordagem anti-câncer, empregando o inibidor ZnPP, de forma a diminuir a atividade de HO-1 e por conseguinte diminuir a capacidade de crescimento do tumor.

Muitas das drogas anti-câncer convencionais, como doxorubicina e camptotecina exercem seus efeitos anti-tumor induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio tóxicas (Simizu *et al.*, 1998). Trabalha-se então com a hipótese de que a redução da atividade da HO-1 pode tornar as células tumorais mais suscetíveis a apoptose induzida por ROS, a qual pode aumentar a capacidade anti-câncer dessas drogas.

Resultados também demonstram a expressão elevada e constitutiva de HO-1 na linhagem celular K562, que é empregada como modelo experimental para leucemia mielóide crônica (LMC). Nessa situação, a HO-1 estaria protegendo as células da morte mediada por apoptose, quando as mesmas são submetidas à imatinibe mesilato, formalmente conhecido como STI571, um poderoso fármaco empregado no tratamento da LMC. A HO-1 seria então uma molécula fundamental na sobrevivência desse tipo de célula tumoral e um possível alvo em células leucêmicas (Mayerhofer *et al.*, 2004). Maiores estudos são ainda necessários para estabelecer quais as rotas que estão realmente sendo influenciadas pela expressão constitutiva dessa enzima, bem como para determinar diferentes estratégias terapêuticas que procurem modular a expressão da HO-1.

1.6 HO-1 e Apoptose

Em condições inflamatórias e de estresse pode ocorrer necrose e apoptose, como resultado de uma liberação de grandes quantidades de heme e subsequente aumento do processo inflamatório e dano celular. No entanto, nessas condições a proteína responsiva a estresse HO-1 será imediatamente induzida. Um grande número de evidências sugere que a expressão de HO-1 age de forma anti-apoptótica em diferentes tipos celulares. Essa ação protetiva foi originalmente demonstrada em células endoteliais, sendo que as mesmas quando expressavam elevadas quantidades de HO-1 não eram suscetíveis a apoptose mediada por TNF- α (Soares *et al.*, 1998). De forma similar, a alta expressão de HO-1 foi demonstrada como protetiva contra apoptose mediada por TNF- α em fibroblastos (Petrache *et al.*, 2000).

O aumento de apoptose, como resultado de tratamento com morfina já é amplamente conhecido (Singhal *et al.*, 1998), mas seu envolvimento com a indução da heme oxigenase foi recentemente descrito (Patel *et al.*, 2003). Indivíduos que recebem doses de morfina têm maior índice de infecções oportunistas. Esse aumento no número de infecções deve-se aos efeitos imunomodulatórios da morfina. Entre esses efeitos modulatórios podemos então destacar a indução da apoptose em macrófagos (Singhal *et al.*, 2000) e a diminuição do *burst* respiratório dessas células que é essencial na geração dos intermediários tóxicos empregados no processo de eliminação de patógenos (Tubaro *et al.*, 1983). O efeito pró-apoptótico da

morfina envolve a geração de NO pelos macrófagos (tanto no estado basal quanto no ativado por LPS), uma vez que o emprego de inibidores da NOS (L-NAME e L-NMMA) reduzem a ocorrência do processo de apoptose (Li and Clark, 2001).

No trabalho de Patel *et al.*, (2003) os autores observaram uma indução da expressão de heme oxigenase, em macrófagos de origem murina, após tratamento com morfina. Além disso, quando juntamente com morfina foi administrada hemina (um conhecido indutor da expressão da HO-1), foi observado um aumento significativo da apoptose dessas células. Tal resultado parece discordar com o papel protetivo desempenhado pela ativação da HO-1, uma vez que a mesma está diretamente relacionada com processos que inibem a cascata de apoptose.

No entanto, no trabalho de Lang *et al.*,(2004) observou-se que o tratamento com hemina resultou na indução de HO-1 e diminuição da apoptose em monócitos submetidos a menor quantidade de soro. Nesse estudo, quantidades crescentes de hemina (2,5 μ M – 10 μ M) resultaram em uma significativa indução da expressão de caspase-3. Quando empregado um inibidor da caspase-3, foi observada uma redução um pouco mais acentuada da apoptose nas culturas já tratadas com hemina.

Procurando então traçar um paralelo entre os estudos com morfina (Patel *et al.*, 2003) e o descrito acima (Lang *et al.*, 2004), observa-se que nos dois trabalhos empregou-se hemina. No entanto, quando a hemina foi administrada concomitante com a morfina (5 μ M de hemina) houve uma potencialização do efeito pró-apoptótico da morfina. Os resultados apresentados no trabalho que empregou somente hemina foram obtidos com uma concentração de 2,5 μ M de hemina, mas observou-se que com o aumento dessa concentração (chegando a um máximo de 10 μ M) houve uma diminuição no efeito anti-apoptótico promovido por esse tratamento. Provavelmente o aumento na concentração de hemina tem como consequência um aumento na atividade da caspase 3 (que ocupa um papel importante nas rotas de apoptose), uma vez que em uma concentração de 10 μ M de hemina o tratamento com o inibidor de caspase-3 passa a ter um efeito significativo na redução da apoptose (ou seja, o efeito da caspase 3 na rota de apoptose passa a ser maior).

Estabelece-se então um efeito da hemina sobre a apoptose apesar da ativação de caspase 3. Esse efeito da hemina passa obrigatoriamente pela HO-1, uma vez que concentrações crescentes de hemina determinam maior expressão dessa enzima. No estudo

que observou aumento na apoptose em músculo liso (Liu *et al.*, 2002), quando o gene da HO-1 foi transfectado através de adenovírus, observou-se também ativação acentuada da caspase-3. Os efeitos ambíguos da HO-1 no que diz respeito à estimulação ou inibição da apoptose são claramente determinados pelo grau de expressão dessa enzima, uma vez que em sistemas empregando adenovírus a expressão atingida é muito maior que em um estado fisiológico normal.

Muitos estudos têm demonstrado que uma baixa expressão de HO-1 (menos de 5x de aumento na atividade) está associada com proteção contra estresse oxidativo. Por exemplo, aumento de 3x na expressão de HO-1 foi associado com proteção contra dano mediado por heme (Abraham *et al.*, 1995), e fibroblastos com expressão endógena de 1,8x de HO-1 foram protegidos de toxicidade de oxigênio (Dennery *et al.*, 1996). No entanto, em algumas circunstâncias clínicas relevantes e modelos experimentais (Rizzardini *et al.*, 1993; Yet *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1990; Ewing *et al.*, 1992), o nível de atividade de HO-1 está acima dos modestos níveis obtidos com sistemas de transfecção e não está claro se esses altos níveis de HO são positivos para a fisiologia da célula. Foi mostrado que o aumento da resistência à toxicidade mediada por oxigênio, com um aumento de 1,8x na atividade de HO-1, pode ser revertido dobrando (aproximadamente 4x) o nível de expressão da HO-1 resultando na perda da citoproteção em fibroblastos (Dennery *et al.*, 1997). Quando a expressão de HO-1 foi elevada de 8 a 9x em um modelo de choque endotóxico, foi observada uma significativa hipotensão (Yet *et al.*, 1997). Fibroblastos de hamster (HA-1) foram expostos a situações de hiperóxia por 24h. Essas células foram transfectadas de forma estável com plasmídeo contendo cDNA de HO-1 de rato. Esse plasmídeo é reponsivo a tetraciclina, permitindo a regulação da expressão de HO-1 em diferentes concentrações de doxiciclina (DOX). Com diferentes concentrações de DOX a atividade de HO-1 foi aumentada entre três e dezessete vezes. Com esse sistema foi possível demonstrar que com baixa atividade (menos de cinco vezes) de HO-1 ocorreu citoproteção, e que com altos níveis de atividade (mais de quinze vezes) houve uma significativa citotoxicidade associada ao tratamento em hiperóxia. Quando administrado um inibidor de HO-1, ou então um quelante de ferro, houve uma diminuição na citotoxicidade, principalmente no tratamento em hiperóxia (Suttner and Dennery, 1999).

Podemos então ter uma rota que determine uma super-expressão de HO-1 e por consequência uma indução da apoptose. A potencialização do efeito apoptótico com a administração de hemina como demonstrado por Patel *et al.*,(2003) seria resultado de uma ativação ainda maior da HO-1. O efeito “tóxico” (pró-apoptótico) da super-expressão de HO-1 poderia então ter origem na ativação mais acentuada da caspase 3 e/ou no acúmulo dos produtos da sua reação. Muitas controvérsias existem a respeito dos efeitos (positivos e negativos) do excesso de CO, Fe⁺² e bilirubina, como já discutido anteriormente.

É necessário também avaliar o papel do NO em toda essa sinalização apoptótica uma vez que já foi demonstrado que a indução de apoptose através da morfina passa por um aumento na expressão de HO-1 (Patel *et al.*, 2003) e também um aumento no NO (Singhal *et al.*, 2000). Em modelos de inflamação, demonstra-se que ocorre uma indução da HO-1, potencializada através da hemina, e também ativação de NOS2 (Vicente *et al.*, 2003). Estudos empregando macrófagos de origem murina demonstraram indução por NO de heme oxigenase (Alcaraz *et al.*, 2001). Por outro lado, demonstrou-se que fatores solúveis de uma linhagem tumoral promoveram a indução da HO-1, através de uma rota independente de NO (Kim *et al.*, 2003). Dessa forma, fica a necessidade de se avaliar o papel do NO na rota que ativa a apoptose na presença de concentrações crescentes de hemina.

Pode-se também supor que a super-expressão da HO-1 possa desencadear o processo de apoptose e, como resultado, parar o avanço do crescimento de células anormais, como no caso de tumores. Considerando que, como visto anteriormente, as células cancerígenas apresentam um nível de expressão elevado da HO-1, a tarefa de ampliar ainda mais essa expressão torna-se potencialmente mais fácil que inibir a mesma. Experimentos que submetam linhagens celulares (K562 e Jurkat, modelos amplamente empregados no estudo de leucemias) a doses do inibidor ZnPP, poderiam ter o nível de apoptose avaliado e comparado com os níveis induzidos através da exposição das K562 a diferentes doses de hemina. Tais resultados poderiam nos levar a uma nova abordagem anti-câncer no que diz respeito ao papel da HO-1, e também corroborar o mecanismo de super-expressão proposto com sendo o desencadeador da atividade pró-apoptótica da HO-1.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Neste contexto, nossa proposta de estudo consiste em:

2.1.1) Analisar a o papel da HO-1 dentro da rota de apoptose, destacando os fatores que determinam o papel antioxidante dessa enzima e identificando elementos que possam modular sua expressão.

2.1.2) Testar a possibilidade que níveis elevados de expressão da HO-1 possam induzir a morte celular programada ou até mesmo conduzir a um estado pró-oxidante.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1) Avaliar o comportamento das linhagens celulares U937 e Jurkat quando submetidas a restrição de soro, hemina e ao inibidor específico da HO-1 (ZnPP).

2.2.1.1) Procurar estabelecer através dos tratamentos um modelo adequado de estudo para situações em que a HO-1 seja super-ativada.

2.2.1.2) Identificar os níveis de NO dentro dos diferentes tratamentos, buscando estabelecer o papel do mesmo em relação aos processos desencadeados pela HO-1.

2.2.1.3) Quantificar a atividade das Caspases 3 e 8 dentro do contexto de super-ativação da HO-1, observando a influência direta dessas enzimas sobre os processos apoptóticos determinados pela HO-1.

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultivo das linhagens celulares U937 e Jurkat

As linhagens celulares humanas U937 e Jurkat foram mantidas em crescimento logarítmico em meio RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 60ug/ml de gentamicina (Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram acondicionadas em estufa a 37°C em presença de 5% de CO₂, em garrafas TPP 75cm² vent (TPP, Trasadingen, Suíça), sofrendo dois repiques por semana.

3.2 Tratamentos

A linhagem celular U937 é empregada como um modelo para estudo *in vitro* das funções biológicas de macrófagos (Larrick *et al.*, 1980). A linhagem celular Jurkat, por sua vez, é amplamente empregada em estudos que envolvem apoptose, uma vez que apresenta grande sensibilidade a situações de estresse (Lopez-Hernandez *et al.*, 2006). O duplo estímulo de estresse, bem com a quantidade de hemina empregada nos tratamentos (20µM), foram adaptados do trabalho de Srisook *et al.* (2005). Nos tratamentos com o inibidor específico da atividade da HO-1 (ZnPP) foi adicionado 10µM do inibidor nos 30 minutos finais de cada tempo de tratamento, conforme Srisook *et al.* (2005). Dessa forma, utilizando hemina, conhecida indutora de HO-1 (Lang *et al.*, 2004), juntamente com restrição de soro, procuramos montar um quadro de alta expressão da HO-1 a fim de estudar possíveis reflexos na sobrevivência celular.

As linhagens celulares U937 e Jurkat foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- a) Células não tratadas, em meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (10%SFB);
- b) Células em 10%SFB juntamente com 10 μ M de zinco II protoporfirina IX (ZnPP), inibidor específico da atividade da HO-1 (10%SFB+ZnPP);
- c) Células em 10%SFB juntamente com 20 μ M de hemina, conhecido indutor da enzima HO-1 (10%SFB+Hemina);
- d) Células em 0,2%SFB;
- e) Células em 0,2%SFB juntamente com 10 μ M de ZnPP (0,2%SFB+ZnPP);
- f) Células em 0,2%SFB juntamente com 20 μ M de hemina (0,2%SFB+Hemina);
- g) Células em 0,2%SFB, combinado o tratamento com 10 μ M de ZnPP e 20 μ M de Hemina (0,2%SFB+ZnPP+Hemina);
- h) Células em 10%SFB, combinado o tratamento com 10 μ M de ZnPP e 20 μ M de hemina (10%SFB+ZnPP+Hemina);
- i) Células em 10%SFB tratadas com quantidades crescentes de hemina (10, 20, 50, 100, 200 e 400 μ M), combinado nos tratamentos de 100 e 200 μ M o inibidor ZnPP.

Os tratamentos foram avaliados, na sua maioria em triplicatas, para atividade de caspase 3/7, quantidade de NO (empregando ensaio de Griess) e viabilidade celular (através de marcação com iodeto de propídeo, e análise por citometria de fluxo). Os tratamentos foram avaliados nos tempos de 2h, 4h, 6h, 12h, 24h e 48h, com exceção do tratamento (i), em que as análises foram realizadas somente em 24h.

3.3 Determinação quantidade de óxido nítrico

Os sobrenadantes dos tratamentos foram coletados e analisados em relação à presença de nitrito nos mesmos. Para isso, o acúmulo de nitrito no meio foi medido pelo ensaio colorimétrico de Griess (Jun, *et. al.*, 1994). As amostras foram incubadas durante 10 minutos com 0,1% *Naphthyl ethyldiamide dihydrochloride*, 1% *sulfanilamide* e 2,5% de ácido

fosfórico e a concentração de nitrito foi determinada por leitura da absorbância a 550nm em comparação a curva padrão de nitrito de sódio.

3.4 Ensaio de atividade das caspases 3/7

As células foram lisadas em PBS e 0,2% de Triton X-100 no gelo e centrifugadas por 5 minutos a 10,000 x g. Em torno de 50 a 100ug de proteína do sobrenadante foram incubadas no tampão de reação contendo (mg/ml): Sacarose 100, CHAPS 0,1, BSA 0,01 e Hepes-NaOH 2,4, pH 7,5. O substrato das caspases 3 e 7 Ac-DEVD-AMC (Peptide Institute) foi usado a uma concentração final de 20 μ M. O produto fluorescente da clivagem do Ac-DEVD-AMC pelas caspases 3 e 7 foi medido com um leitor de microplacas (Molecular Devices Corporation, California, USA), usando excitação 370 nm e emissão 460 nm, sendo que a inclinação da quantidade de substrato fluorescente acumulado fornece a atividade da caspase. O resultado final é expresso em fmols por minuto por μ g de proteína.

3.4 PCR em tempo real

RNA total das células foi extraído empregando TRIZOL (Invitrogen, USA), seguindo recomendações do fabricante, e o cDNA sintetizado a partir dessas amostras. A reação para o PCR em tempo real foi preparada empregando Platinum®SYBR® Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen, USA) com os primers 5'-CGTTACTCCACCAACAATGG-3' e 5'-CGAAACCACTCGTATTTGGG (NOS2); 5'-AGGATTTGTCAGAGGCCCTG-3' e 5'-TTGCGGTGCAGCTCTTCTGG-3'(HO-1); 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3' e 5'-GCTCATTGTAGAAGGTGTG-3'(B-actina). As reações foram amplificadas utilizando 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). As análises dos resultados foram realizadas no 7500 System SDS *software* (Applied Biosystems, USA), usando os dados de expressão de B-actina como normalizador. Os dados de expressão de HO-1 e NOS2 apresentados são resultado de um único experimento.

3.5 Viabilidade Celular

O volume de 500ul de cada tratamento foi analisado empregando Iodeto de Propídeo (BD Biosciences Pharmigen, USA) e citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, São Jose, CA, USA) para detecção da viabilidade celular. Foram contados 10.000 eventos de cada tratamento, bem como foi avaliado variações no tamanho e complexidade celular.

3.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente empregando ANOVA *One Way* e *Two Way*. Quando as premissas de homocestaticidade não foram atingidas pelos dados empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As análises foram feitas no programa *SigmaStat for Windows Version 3.11* (Copyright© 2004 Systat Software, Inc), sendo considerados significantes todos os valores de “p” inferiores a 0,05.

4. Resultados

4.1 Restrição de soro mais hemina determinam alta atividade de caspase 3/7, com envolvimento da enzima HO-1.

Os resultados de atividade de caspase 3/7 para a linhagem celular U937 e Jurkat estão apresentados na figura 2 (A, B, C e D).

Observa-se claramente na figura 2A um aumento significativo ($p < 0.001$) na atividade de caspase 3/7 no tempo de 12h, para o tratamento que emprega 0,2%SFB+Hemina($20\mu\text{M}$). Esse índice é reduzido significativamente ($p < 0.001$) no tratamento 0,2%+ZnPP($10\mu\text{M}$)+Hemina($20\mu\text{M}$), na linhagem celular U937.

A linhagem celular Jurkat tem seus dados de atividade de caspase 3/7 apresentados na figura 2B. Da mesma forma que U937, nota-se um aumento significativo ($p < 0.001$) na atividade de caspase 3/7 para o tratamento 0,2%SFB+Hemina($20\mu\text{M}$). Além disso, como em U937, o tratamento 0,2%+ZnPP($10\mu\text{M}$)+Hemina($20\mu\text{M}$) reduziu significativamente ($p < 0.001$) este índice a menos da metade.

O tempo de 24h ainda mantém elevados valores de atividade para ambas as linhagens, no tratamento com 0,2%SFB+Hemina($20\mu\text{M}$). Em Jurkat, no tempo de 24h, a redução na atividade de caspase 3/7 promovida pela adição do inibidor ZnPP mantém-se significativa ($p < 0.001$). Nota-se que em U937, os tratamentos com 0,2%SFB e 10%SFB+Hemina($20\mu\text{M}$) tiveram valores mais altos em 24h, quando comparados com os demais tempos.

Nas figuras 2C e D estão demonstrados a cinética de 1h para os diferentes tratamentos que empregaram restrição de soro, hemina e ZnPP, após 12h. Dessa forma, fica ainda mais evidente a alta ativação de caspase 3/7 promovida pelo tratamento 0,2%SFB+Hemina($20\mu\text{M}$), bem como a acentuada redução relativa na atividade de caspase 3/7 promovida pela adição do inibidor específico de HO-1, para ambas as linhagens.

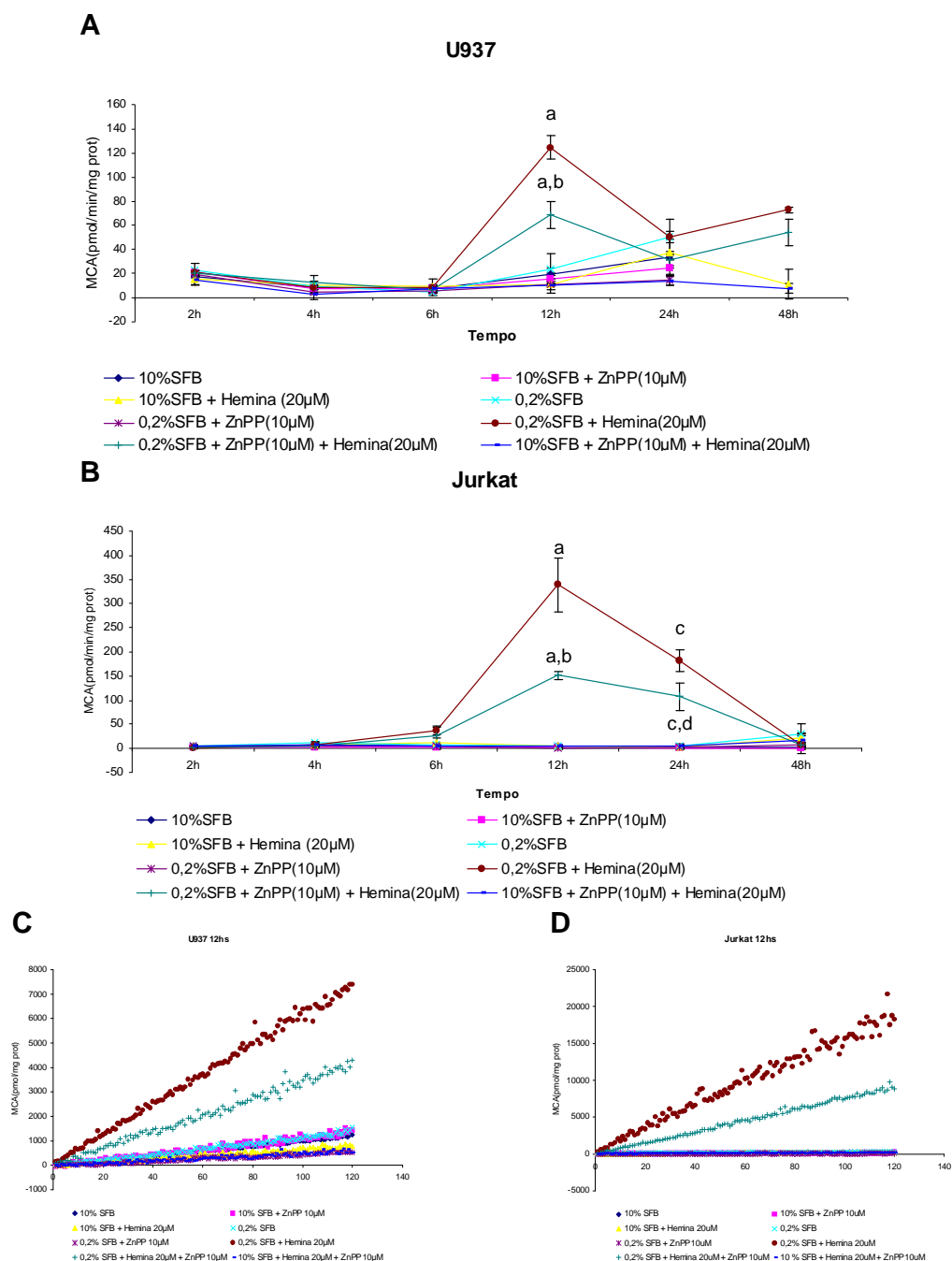


Figura 2 – Atividade de caspase 3/7 detectada nos tratamentos empregando restrição de soro (0.2%), hemina (20µM) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10µM). **(A)** Atividade de caspase 3/7 na linhagem celular U937, após 30min de reação, nos tempos de 2,4,6,12,24 e 48h de tratamento (“a” atividades de caspase 3/7 significativamente maiores que os demais tratamentos no tempo de 12h para $p < 0.001$; “b” atividade de caspase 3/7 significativamente menor em relação ao tratamento 0.2% SFB + Hemina 20µM no tempo de 12h para $p < 0.001$). **(B)** Atividade de caspase 3/7 na linhagem celular Jurkat, após 30min de reação, nos tempos de 2,4,6,12,24 e 48h de tratamento (“a” atividades de caspase 3/7 significativamente maiores que os demais tratamentos no tempo de 12h para $p < 0.001$, e significativamente maiores que os demais tempos para $p < 0.001$; “b” atividade de caspase 3/7 significativamente menor em relação ao tratamento 0.2% SFB + Hemina 20µM no tempo de 12h para $p < 0.001$; “c” atividades de caspase 3/7 significativamente maiores que os demais tratamentos no tempo de 24h para $p < 0.001$; “d” atividade de caspase 3/7 significativamente menor em relação ao tratamento 0.2% SFB + Hemina 20µM no tempo de 24h para $p < 0.001$). **(C)** e **(D)** Cinética de 1h da atividade de caspase 3/7, em 12h de tratamento com restrição de soro, hemina e ZnPP, em U937 e Jurkat respectivamente.

4.2 Quantidades crescentes de hemina determinam comportamentos distintos em U937 e Jurkat.

As atividades de caspase 3/7 em U937 e Jurkat foram também medidas nos tratamentos com quantidades crescentes de hemina, em 24h de tratamento. Os dados estão apresentados na figura 3 (A,B,C e D).

Nota-se uma clara tendência à diminuição na atividade de caspase 3/7 com o aumento da quantidade de hemina. Nos tratamentos com 12.5 e 25 μ M de hemina foram detectados níveis de ativação de casapse 3/7 significativamente superiores ao tratamento empregando 200 μ M hemina+ZnPP 10 μ M ($p<0.05$). Além disso, não se detectou uma influência clara do inibidor ZnPP na atividade de caspase 3/7, nas quantidades de 100 e 200 μ M de hemina. Os níveis de atividade de caspase 3/7 observados para U937 (figura 3A) são bem mais baixos que aqueles detectados para Jurkat (figura 3B), quando tratadas com hemina.

A atividade de caspase 3/7 em Jurkat foi medida nos tratamentos com quantidades crescentes de hemina, após 24h de tratamento. Os dados estão apresentados na figura 3B. A linhagem celular Jurkat apresenta claramente uma tendência ao aumento da atividade de caspase 3/7 com o aumento da quantidade de hemina. No tratamento de 200 μ M de hemina atingem-se valores de ativação de caspase 3/7 siginificativamente superiores ($p<0.05$) aos demais tratamentos, sendo que a adição do inibidor promove um aumento ainda maior no nível de ativação ($p<0.05$).

As figuras 3C e D mostram em detalhe a cinética de 1h e 30min obtida para as linhagens U937 e Jurkat respectivamente. Nessas figuras fica ainda mais claro o padrão observado nas figuras 3A e B, salientando o comportamento oposto apresentado pela U937 em relação à Jurkat.

4.3 Óxido nítrico não está envolvido nas rotas determinadas pelos tratamentos que empregam restrição de soro, hemina e ZnPP.

A quantidade de óxido nítrico (NO) presente no sobrenadante das culturas foi analisada para as linhagens celulares U937 e Jurkat, através do Ensaio de Griess.Os resultados obtidos para U937 e Jurkat estão apresentados na figura 4 (A e B).

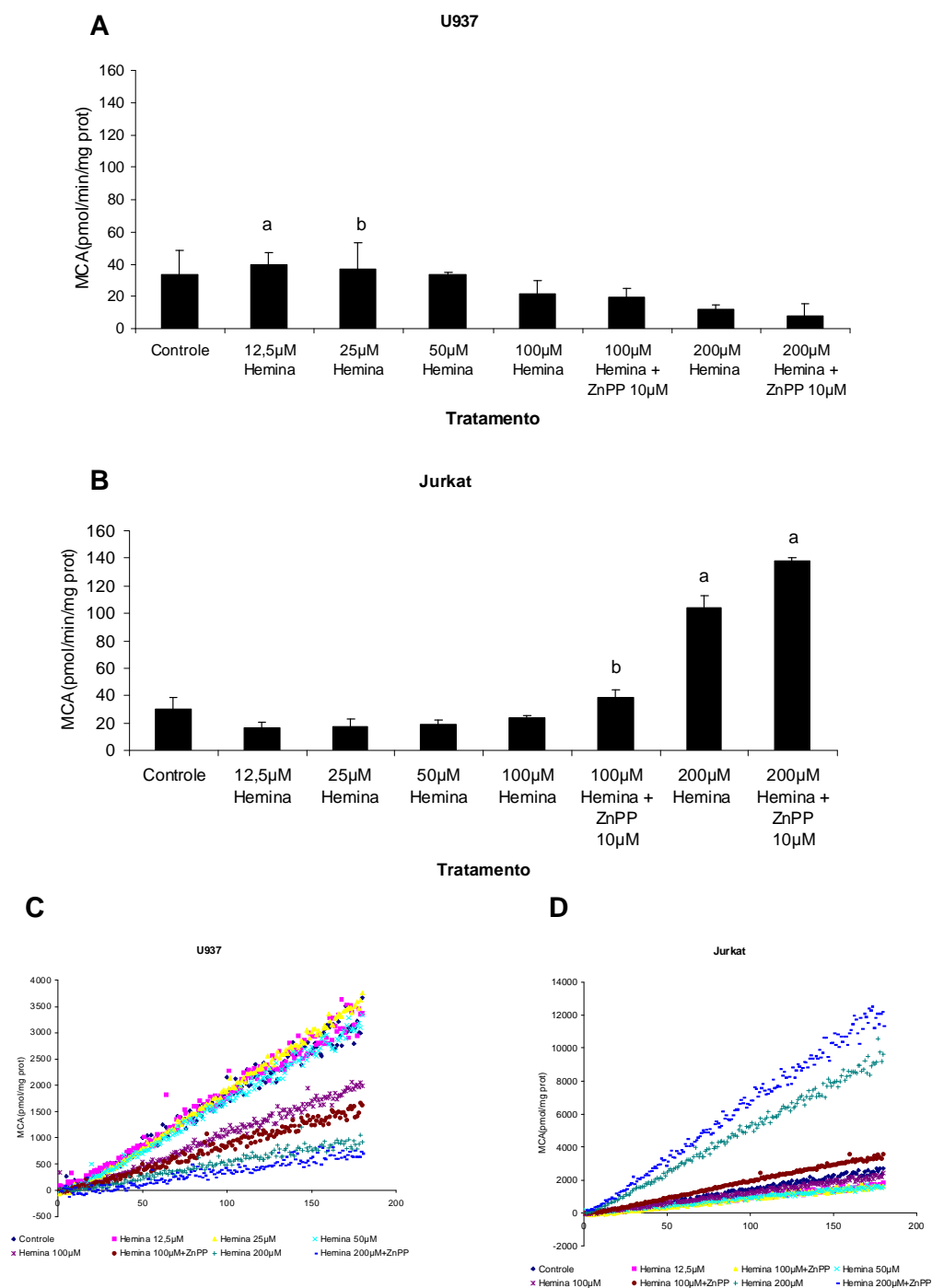


Figura 3 – Atividade de caspase 3/7 detectada nos tratamentos empregando quantidades crescentes de hemina (12,5, 25, 50, 100 e 200µM) e o inibidor de zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10µM). **(A)** Atividade de caspase 3/7 na linhagem celular U937, em 45min de reação, após 24h de tratamento com quantidades crescentes de hemina e ZnPP (“a” tratamento com atividade de caspase 3/7 significativamente maior que os tratamentos 200µM hemina e 200µM Hemina+ZnPP 10µM para $p < 0.05$; “b” tratamento com atividade de caspase 3/7 significativamente maior que o tratamento 200µM Hemina+ZnPP 10µM). **(B)** Atividade de caspase 3/7 na linhagem celular Jurkat, em 45min de reação, após 24h de tratamento com quantidades crescentes de hemina e ZnPP (“a” tratamento com atividade de caspase 3/7 significativamente maior que os demais tratamentos 12,5, 25, 50µM hemina para $p < 0.05$). **(C)** e **(D)** Cinética de 1h e 30 min da atividade de caspase 3/7, após 24h de tratamento em quantidades crescentes de hemina, em U937 e Jurkat respectivamente.

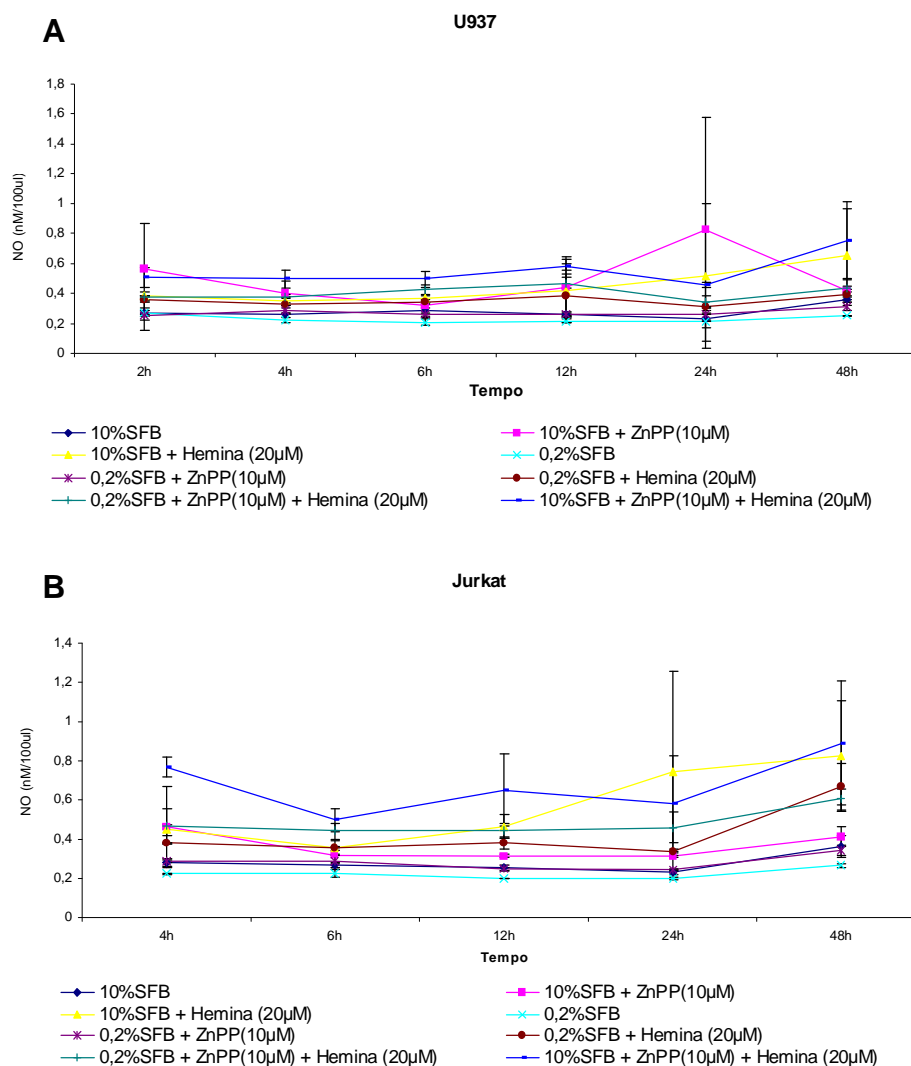


Figura 4 – Quantidade de nitrito detectado nos sobrenadantes através do ensaio de Griess, nos tratamentos empregando restrição de soro (0.2%), hemina (20μM) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10μM). **(A)** Quantidade de nitrito detectado nos sobrenadantes na linhagem celular U937, nos tempos de 2,4,6,12,24 e 48h de tratamento. **(B)** Quantidade de nitrito detectado nos sobrenadantes na linhagem celular Jurkat, nos tempos de 2,4,6,12,24 e 48h de tratamento.

Nos diferentes tempos, os tratamentos não apresentam qualquer alteração característica. Os pontos que apresentam leituras elevadas apresentam grandes desvios, o que não confere confiabilidade aos dados. Dessa forma, não é possível demonstrar a participação do óxido nítrico nas rotas determinadas por esses tratamentos.

4.4 Relação de dose dependência entre quantidade de hemina e a quantidade de NO detectada nos tratamentos, sem envolvimento da HO-1.

A quantidade de NO foi também medida nos sobrenadantes das culturas de U937 e Jurkat tratadas com quantidades crescentes de hemina, após 24h de tratamento. Os dados estão apresentados na figura 5 (A e B).

Nota-se claramente que, para ambas as linhagens, ocorre uma relação dose-dependência entre quantidade de hemina e quantidade de NO, sem haver um efeito claro do inibidor nas quantidades de 100 e 200 μ M de hemina. Em U937 atingem-se quantidades de NO significativamente superiores ao controle nos tratamentos 200 μ M hemina+ZnPP 10 μ M e 400 μ M hemina ($p < 0.05$). Já em Jurkat, as quantidades de óxido nítrico no tratamento com 400 μ M hemina são significativamente superiores ao controle ($p < 0.05$). Dessa forma, fica demonstrada uma possível participação do NO nas rotas ativadas por hemina, participação esta que parece não ter como causa a HO-1.

4.5 Viabilidade celular não é alterada pelos tratamentos com restrição de soro, hemina e ZnPP.

A viabilidade celular foi avaliada através de marcação com iodeto de propídeo seguida por análise em citometria de fluxo. Os dados para U937 e Jurkat estão apresentados na figura 6 (A e B).

Observa-se que em Jurkat (figura 6B) há uma queda significativa na viabilidade nos pontos referentes a 24h ($p < 0.001$) e 48h ($p < 0.001$), tanto no tratamento 0,2%SFB+Hemina(20 μ M) quanto no tratamento 0,2%SFB+ZnPP(10 μ M)+Hemina(20 μ M). Além disso, em 2h de tratamento, observa-se uma redução significativa na viabilidade nos tratamentos 0,2%SFB+ZnPP(10 μ M)($p < 0.001$), 0,2%SFB+Hemina (20 μ M)($p < 0.05$) e 0,2%SFB+ZnPP(10 μ M)+Hemina(20 μ M)($p < 0.001$). Considerando que essa queda na viabilidade ocorreu em 2h de tratamento, há a possibilidade de ocorrência de algum problema experimental específico para esses três tratamentos, nesse tempo.

Para U937 (figura 6A) ocorre uma queda significativa na viabilidade, em 48h, no tratamento 0,2%SFB+ZnPP(10 μ M)+Hemina(20 μ M)($p < 0.001$). Da mesma forma que em Jurkat, é observada uma viabilidade significativamente baixa no tratamento 0,2%SFB+ZnPP(10 μ M)($p < 0.001$), após 2 e 4h. Atribui-se essa queda também a um problema experimental nesse tempo.

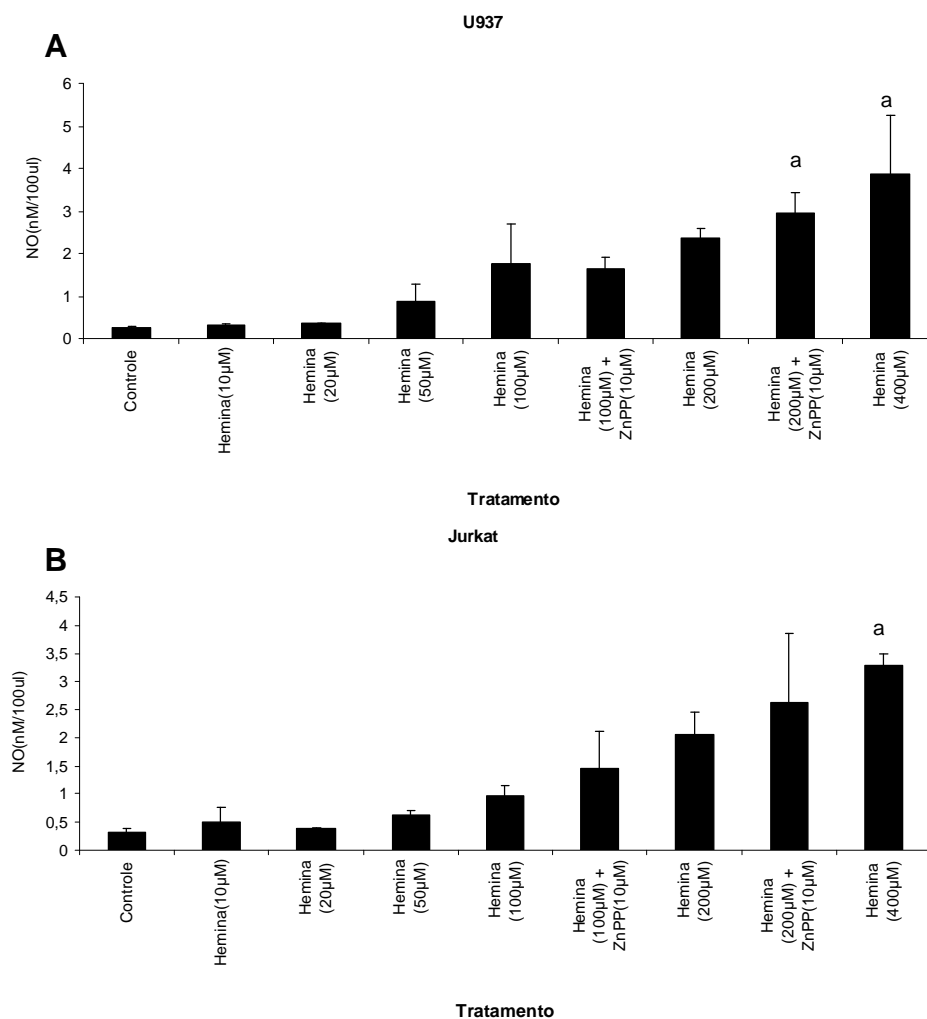


Figura 5 – Quantidade de nitrito detectado nos sobrenadantes através do ensaio de Griess, nos tratamentos empregando quantidades crescentes de hemina (10, 20, 50 100, 200 e 400 μ M) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10 μ M). **(A)** Quantidade de nitrito detectado nos sobrenadantes na linhagem celular U937, após 24h de tratamento (“a” tratamentos com quantidade de óxido nítrico significativamente maior que o controle para $p < 0.05$). **(B)** Quantidade de nitrito detectado nos sobrenadantes na linhagem celular Jurkat, após 24h de tratamento (“a” tratamento com quantidade de óxido nítrico significativamente maior que o controle para $p < 0.05$).

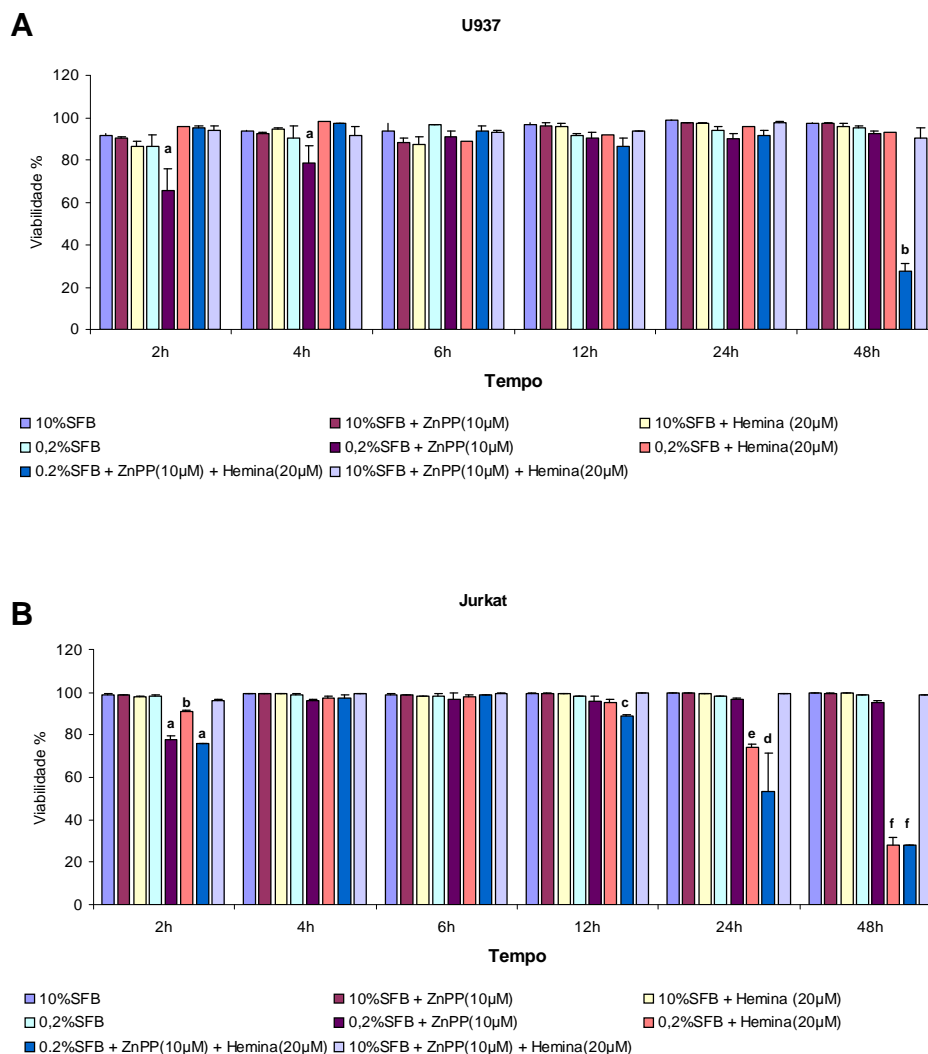


Figura 6 – Viabilidade celular avaliada através de citometria de fluxo, empregando iodeto de propídeo, nos tratamentos empregando restrição de soro (0.2%), hemina (20µM) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10µM). **(A)** Viabilidade celular detectada na linhagem celular U937, nos tempos de 2,4,6,12,24 e 48h de tratamento (“a” viabilidade significativamente inferior nos diferentes tempos, e inferior em relação aos demais tratamentos dentro do tempos de 2 e 4h para $p < 0.001$; “b” viabilidade significativamente inferior nos diferentes tempos, e inferior em relação aos demais tratamentos dentro do tempo de 48h para $p < 0.001$). **(B)** Viabilidade celular detectada na linhagem celular Jurkat, nos tempos de 2,4,6,12,24 e 48h de tratamento (“a” viabilidade significativamente alterada nos diferentes tempos, e inferior em relação aos demais tratamentos dentro do tempo de 2h para $p < 0.001$; “b” viabilidade significativamente alterada nos diferentes tempos, e inferior em relação aos tratamentos 10%SFB e 10%SFB+ZnPP(10µM) dentro do tempo de 2h para $p < 0.05$; “c” viabilidade significativamente inferior relação aos demais tratamentos dentro do tempo de 12h para $p < 0.05$; “e” e “d” viabilidade significativamente alterada nos diferentes tempos, e inferior em relação aos demais tratamentos dentro do tempo de 24h para $p < 0.001$, e alterados entre si para $p < 0.001$; “f” viabilidade significativamente inferior nos diferentes tempos, e inferior em relação aos demais tratamentos dentro do tempo de 48h para $p < 0.001$).

4.6 Alterações na viabilidade celular são observadas apenas em altas quantidades de hemina

A viabilidade em U937 e Jurkat referente ao tratamento com quantidades crescentes de hemina também foi avaliada, e os dados estão apresentados na figura 7 (A e B).

Observa-se que a viabilidade em ambas as linhagens parece não ser alterada pelo aumento da quantidade de hemina, exceto para os tratamentos com 400 μ M (7A e B) onde houve uma queda significativa na viabilidade ($p < 0.001$). No entanto, em U937, o emprego do inibidor no tratamento com 200 μ M de hemina, induziu uma significativa queda na viabilidade (figura 7B) ($p < 0.001$). Em U937 é observado que o controle apresenta um valor significativamente mais baixo de viabilidade ($p < 0.001$) que os tratamentos com 20 μ M hemina, 50 μ M hemina, 100 μ M hemina, 200 μ M hemina e 100 μ M de hemina+ZnPP(10 μ M), indicando um possível aumento na viabilidade proporcionada pela hemina em quantidades intermediárias.

4.7 Análise da morfologia de Jurkat e U937 indicam alterações características de apoptose

Analisando Jurkat e U937 quanto à forma e complexidade, observam-se algumas alterações interessantes ao longo dos tratamentos. Aqueles tratamentos que envolvem o inibidor, juntamente com redução na quantidade de SFB, levam a um aumento na intensidade da marcação com iodeto de propídeo, o que parece não representar células mortas, principalmente quando se considera as análises de tamanho e complexidade. A figura 8 (A, B, C e D) demonstra essa alteração, comparando um controle não tratado com um tratamento de menos soro e inibidor. Além disso, nas leituras dos tratamentos 0,2%SFB+Hemina(20 μ M) e 0,2%SFB+ZnPP(10 μ M), em 12h, observa-se uma alteração na população de células, onde ocorre uma diminuição no tamanho e aumento na complexidade destas células. Esse efeito está demonstrado na figura 9 (A, B, C e D), onde são comparados ambos os tratamentos com o controle, em 12h, em Jurkat, uma vez que nessa linhagem esse efeito está mais pronunciado.

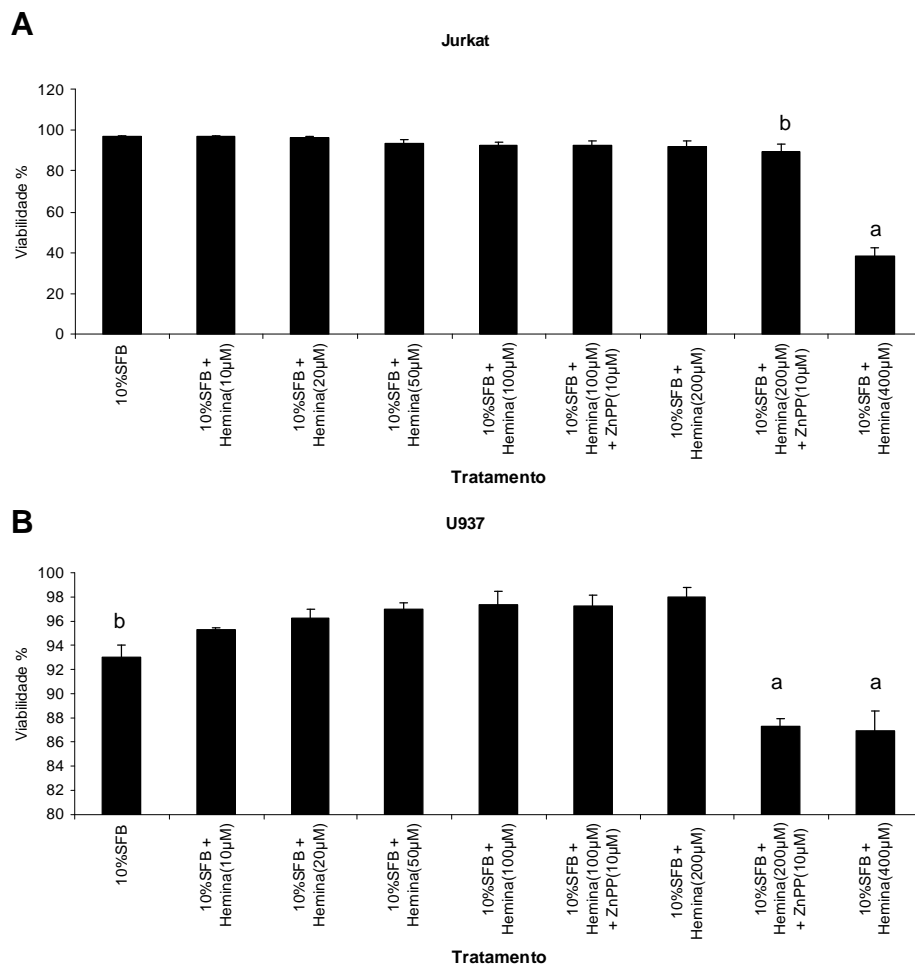


Figura 7 – Viabilidade celular avaliada através de citometria de fluxo, empregando iodeto de propídeo, nos tratamentos empregando quantidades crescentes de hemina (10, 20, 50 100, 200 e 400µM) e zinco II protoporfirina IX, ZnPP (10µM). **(A)** Viabilidade celular detectada na linhagem celular Jurkat, após 24h de tratamento (“a” viabilidade significativamente menor que os demais tratamentos para $p < 0.001$; “b” viabilidade significativamente menor que os tratamentos 10%SFB, 10%SFB+hemina(10µM) e 10%SFB+hemina(20µM) para $p < 0.05$). **(B)** Viabilidade celular detectada na linhagem celular Jurkat, após 24h de tratamento (“a” viabilidade significativamente menor que os demais tratamentos para $p < 0.001$; “b” viabilidade significativamente menor que os tratamentos 10%SFB+hemina(20µM), 10%SFB+hemina(50µM), 10%SFB+hemina(100µM), 10%SFB+hemina(100µM)+ZnPP(10µM) e 10%SFB+hemina(200µM) para $p < 0.001$).

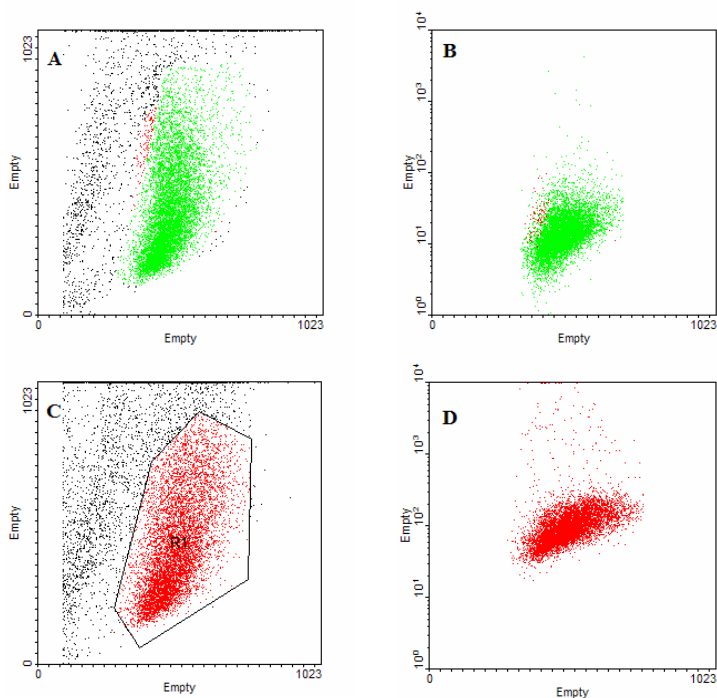


Figura 8 – Análise da morfologia e viabilidade celular. Em (A) está apresentado um gráfico de FSC-H x SSC-H, de células Jurkat, mantidas durante 2h em 10%SFB. O mesmo tratamento está apresentado em (B), em um gráfico de FSC-H x FL2. Em (A) e (B) está destacado em verde a população de células. Em (C) está apresentado um gráfico de FSC-H x SSC-H, de células Jurkat, mantidas durante 2h em 0,2%SFB+ZnPP(10μM). O mesmo tratamento está apresentado em (D), em um gráfico de FSC-H x FL2. Em (C) e (D) está destacado em vermelho a população de células, evidenciando um aumento na permeabilidade a PI, quando comparado com (B).

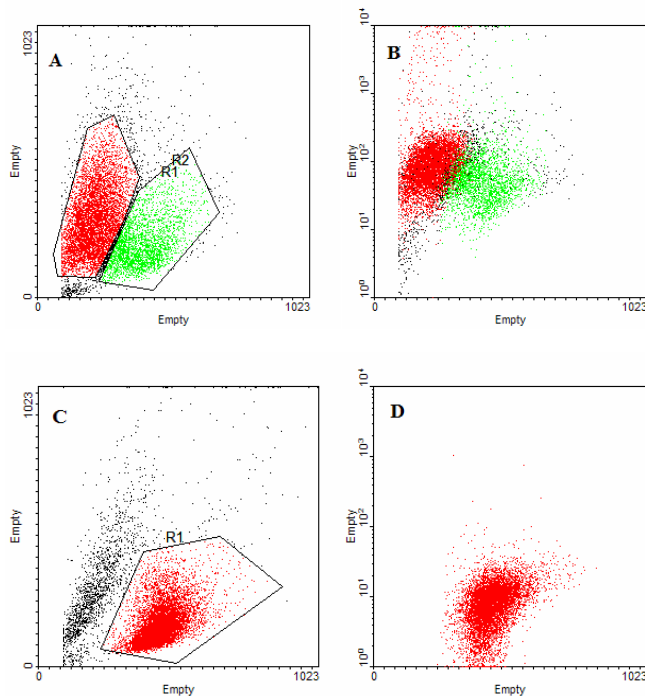


Figura 9 - Análise da morfologia e viabilidade celular. Em (A) está apresentado um gráfico de FSC-H x SSC-H, de células Jurkat, mantidas durante 12h em 0,2%SFB+Hemina(20uM). O mesmo tratamento está apresentado em (B), em um gráfico de FSC-H x FL2. Em (A) e (B) estão destacadas duas populações de células (vermelho – células com redução do tamanho e aumento da complexidade, e verde – células sem alteração na morfologia). Em (C) está apresentado um gráfico de FSC-H x SSC-H, de células Jurkat, mantidas durante 12h em 10%SFB. O mesmo tratamento está apresentado em (D), em um gráfico de FSC-H x FL2. Em (C) e (D) está destacado em vermelho a população de células, evidenciando um comportamento diferente do evidencia em (A) e (B).

4.8 Análise da expressão de HO-1 e iNOs indicam padrões opostos em U937 e Jurkat.

A expressão de HO-1, iNOS e B actina (como normalizador) nas linhagens celulares U937 e Jurkat foram analisadas através de PCR em tempo real, com primers específicos. Células de ambas as linhagens, tratadas com quantidades crescentes de hemina (10, 20, 50 e 100 μ M), em 24h, tiveram as quantidades dos transcritos de HO-1 e iNOS analisadas.

Os resultados estão apresentados na figura 10. Fica claro que a expressão de HO-1 em U937 (figura 10A) está relacionada de forma dose-dependente com a quantidade de hemina. A expressão de iNOS (figura 10B) não apresenta essa relação, no entanto a indução da expressão de iNOS está ocorrendo. Nota-se que a quantidade de 50 μ M não apresenta indução de iNOS em U937, contudo esse tratamento terá de ser repetido para se constatar a possibilidade de ter ocorrido uma falha na amplificação do transcrito.

Surpreendentemente os resultados obtidos para Jurkat (figuras 10C e D), são o oposto do observado para U937. Observa-se uma relação de dose-dependência, tanto para HO-1 quanto para iNOS, em que quantidades crescentes de hemina conduzem à diminuição da expressão desses transcritos.

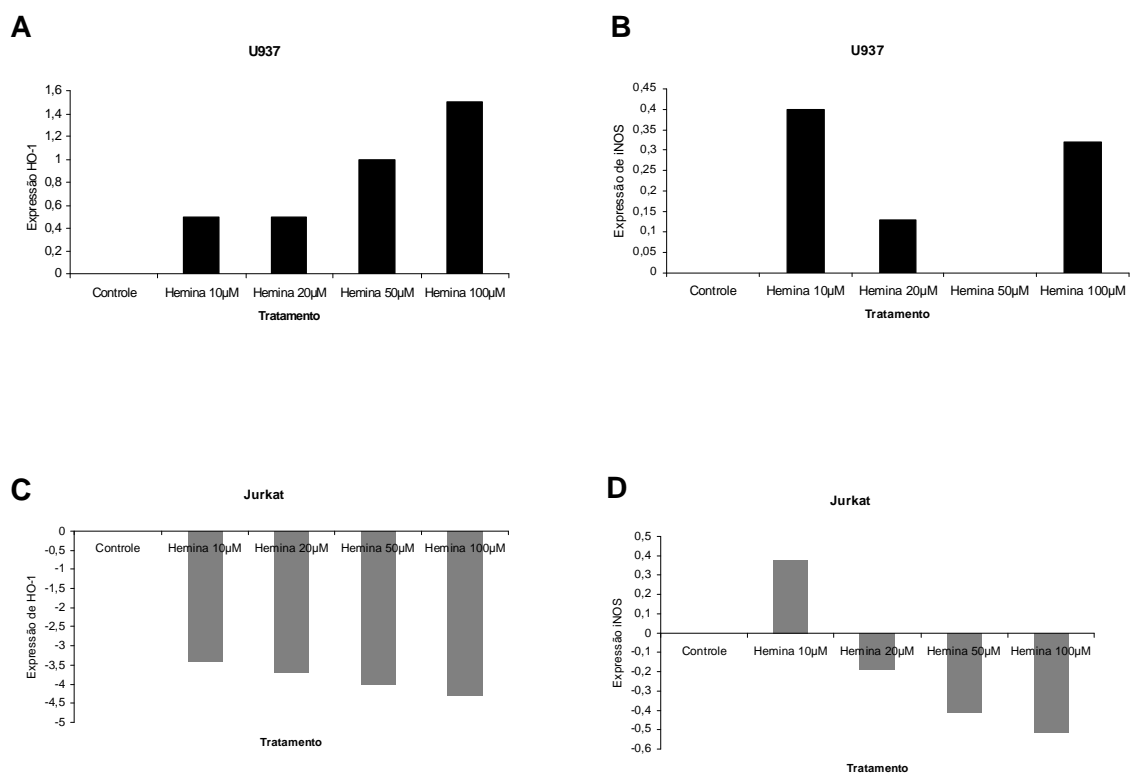


Figura 10 – Avaliação da quantidade de transcritos de HO-1 e iNOS, em quantidade crescentes de hemina (10, 20, 50 e 100µM), após 24h de tratamento, através da PCR em tempo real. Todas as medidas da quantidade de transcritos foram realizadas relativas ao controle não tratado, considerando o mesmo como 0. **(A)** Expressão da HO-1 na linhagem celular U937. **(B)** Expressão da iNOS na linhagem celular U937. **(C)** Expressão da HO-1 na linhagem celular Jurkat. **(D)** Expressão da iNOS na linhagem celular Jurkat.

5. Discussão

Os resultados obtidos para atividade de caspase 3/7 estão de acordo com o encontrado na literatura para cultura primária de monócitos, em que é observada indução de caspase 3 em tratamentos que estimulam a expressão de HO-1 (Lang *et al.*, 2004). Os tratamentos que apresentaram atividade significativamente maior de caspase 3/7 (figuras 2A-D): 0,2%SFB+Hemina(20 μ M) e 0,2%+ZnPP(10 μ M)+Hemina(20 μ M), têm como característica comum a presença de um duplo estímulo de estresse, ou seja um duplo estímulo para HO-1, mas diferem quanto à presença do inibidor específico da atividade da enzima HO-1. Dessa forma, quando se observa significativa redução da atividade de caspase 3/7, pela adição do ZnPP, pode-se inferir que a HO-1 está tendo um papel importante nesse processo. O papel protetivo da HO-1, destacado principalmente através de seu potencial anti-apoptótico (Fang *et al.*, 2003), acaba sendo questionado, caso contrário temos que conceber a idéia que os altos níveis de atividade de caspase 3/7, observados em Jurkat e U937, em 12h de tratamento (figuras 2C e D), não resultam em apoptose. Esse comportamento pró-oxidante da HO-1 observado em nossos experimentados já foi sugerido em outros trabalhos. Por exemplo, no trabalho de Liu *et al.*, (2002) foi demonstrado que a super-expressão de HO-1 ou a administração exógena de biliverdina ou bilirubina estimula a apoptose em células de músculo liso (*smooth muscle cells*, SMCs). Macrófagos de origem murina, quando tratados com morfina, apresentam redução na migração e aumento na ocorrência de apoptose. Nesse contexto, ocorre a indução de HO-1, sendo que o tratamento com hemina, concomitante com Morfina, levou não só a uma maior redução de migração dos macrófagos como a um aumento na apoptose dos macrófagos peritoniais. O tratamento de macrófagos murinos com o inibidor específico da HO-1, ZnPP, atenuou o efeito de redução da migração e aumento da apoptose gerado pela morfina (Patel *et al.*, 2003). Células dependentes de ancoragem, ECV304, tiveram a expressão de HO-1 induzida através do tratamento com hemina e da transfecção do gene da HO-1. Nos clones que apresentaram alta expressão de HO-1 constatou-se aumento da susceptibilidade a dano oxidativo mediado por peróxido de hidrogênio, ao contrário dos clones que apresentaram expressão moderada de HO-1 (Maruhashi *et al.*, 2004). Astrócitos de ratos

modificados para super-expressar HO-1 humana, apresentaram, após três dias em cultura, significativo dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA mitocondriais, parcial parada no crescimento e aumento na morte celular. Esses efeitos foram atenuados com o emprego de mesoporfirina, inibidor competitivo da HO-1, ou através do emprego do quelante de ferro desferroxamina (Song *et al.*, 2006). Fibroblastos de hamster (HA-1) foram expostos a situações de hiperóxia por 24h. A expressão da HO-1 nessas células foi modulada empregando um plasmídeo regulado por tetraciclina. Com esse sistema foi possível demonstrar que com baixa atividade (menos de cinco vezes) de HO-1 ocorreu citoproteção, e que em altos níveis de atividade (mais de quinze vezes) houve uma significativa citotoxicidade associada ao tratamento em hiperóxia. Ainda, quando administrado um inibidor de HO-1, ou então um quelante de ferro, houve uma diminuição na citotoxicidade, principalmente no tratamento em hiperóxia (Suttner and Dennery, 1999). Todos esses resultados confirmam o que foi observado em nosso trabalho, e só demonstram como é tênue a linha que separa o potencial anti-apotótico da HO-1 de um papel pró-apoptótico em circunstâncias de super-expressão.

É importante destacar que esse potencial pró-apoptótico apresentado pela HO-1 não é apenas decorrência de manipulações *in vitro* sem relação a uma função fisiológica normal. O papel fundamental apresentado pela HO-1 no controle da rejeição, em transplante de órgãos, está bem descrito na literatura (Sato *et al.*, 2000). McDaid *et al.*, (2005) sugeriram novas funções para a HO-1, a qual prolongaria a sobrevivência de enxertos, mediando a ativação da morte celular induzida (AICD) de células T CD4⁺ responsiva a antígenos aloderivados, resultando em imunomodulação. Assim, a indução da expressão da HO-1 aceleraria a deleção clonal das células T CD4⁺ aloreativas da periferia, através de AICD, o que representaria um mecanismo chave para a sobrevivência de órgãos transplantados. Portanto, fica claro que propriedades pró-apotóticas da HO-1 encontram funções importantes dentro da fisiologia do organismo, principalmente no que diz respeito a contextos de resolução de inflamação.

No entanto, já foi descrito que o CO, importante produto da atividade catalítica da HO-1, confere um potente efeito anti-proliferativo em células musculares lisas vasculares e em células das vias aéreas, de forma dependente das rotas de sinalização de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e cGMP (*GMP cíclico*) (Song *et al.*, 2002; Otterbein *et al.*, 2003). Em outro estudo, CO inibiu a proliferação de linfócitos T ativados, através de uma rota

independente de MAPK e cGMP. Em estudos de inibição das caspase-3 e caspase-8, mostrou-se que somente com a inibição da caspase-8 houve uma diminuição no efeito antiproliferativo do CO, evidenciando uma dependência de CO em relação a essa molécula para suprimir a proliferação (Song *et al.*, 2004). Considerando esses resultados, podemos considerar que as caspases tenham outras funções que não somente direcionar a apoptose, e que essas funções adicionais estão também relacionadas à sobrevivência celular. A alta atividade de caspase 3/7 observada em 12h, tanto para Jurkat quanto para U937, não apresenta relação com uma diminuição na viabilidade de células de ambas as linhagens no mesmo tempo de tratamento (figuras 6A e 6B). A linhagem celular Jurkat apresenta uma significativa diminuição na viabilidade nos tempos de 24h e 48h, podendo ser esse um resultado da alta ativação de caspases que ocorre em 12h (figura 2D). Ainda assim, essa diferença de tempo pode ser grande demais para que a diminuição de viabilidade seja resultado da ativação de caspase 3/7. Desse modo, fica a necessidade de novos experimentos onde tempos entre 12 e 24h sejam analisados a fim de identificar uma possível redução na viabilidade celular. A linhagem U937 apresenta uma queda significativa na viabilidade no tratamento 0,2%SFB+Hemina(20uM)+ZnPP(10uM), após 48h. Esse efeito pode ser um reflexo da alta atividade de caspase 3/7 observada para esse tratamento (figura 2A), mas o mesmo não se repete para o tratamento 0,2%SFB+Hemina(20uM). Dessa forma, deve-se considerar a possibilidade que essa queda na viabilidade somente para esse tratamento esteja associada a algum efeito tóxico do ZnPP em células tratadas por 48h.

Nesse contexto, é importante destacar que as alterações morfológicas observadas na citometria de fluxo, nas células que sofreram os tratamentos 0,2%SFB +Hemina(20 μ M) e 0,2%SFB+ZnPP(10 μ M)+Hemina(20 μ M), em 12h, coincidem com alta atividade de caspase 3/7. Essa alteração morfológica observada (figuras 9A-D) é caracterizada por uma diminuição no tamanho e um aumento na complexidade das células. Tais alterações são descritas como sendo indicativas de apoptose (Omerod, 2001). Tais resultados embasam de forma mais sólida a ocorrência do processo de apoptose em ambas as linhagens celulares, no tempo de 12h, para os tratamentos que envolvem restrição de soro, hemina e ZnPP.

O aumento da fluorescência basal nos tratamentos que envolvem o inibidor ZnPP (figuras 8A-D) não havia sido descrito na literatura. Esse fato pode ser resultado de uma

influência do ZnPP aumentando a permeabilidade basal das células ao iodeto de propídeo. No entanto, a análise conjunta da morfologia e fluorescência indica que apesar dos níveis basais estarem mais elevados, as células representam uma população viável.

O emprego de quantidades crescentes de hemina tinha por objetivo tentar super-expressar a enzima HO-1, tanto em U937 quanto em Jurkat, para analisar os possíveis efeitos apoptóticos e/ou anti-apoptóticos dessa enzima. Os resultados obtidos, no entanto, são surpreendentes, e até então não descritos na literatura. Diferentemente do que se obteve com os tratamentos que empregaram restrição de soro, onde tanto U937 quanto Jurkat, se comportaram de forma semelhante, em quantidades crescentes de hemina as linhagens celulares apresentaram comportamentos distintos quanto à ativação de caspase 3/7 (figuras 3A-D) e expressão de HO-1 e iNOs (figuras 10A-D). Nas figuras 3A-D observa-se que a linhagem celular U937 apresenta uma tendência a diminuição na atividade de caspase 3/7, sem um efeito claro da adição do ZnPP, já a linhagem celular Jurkat, apresenta um padrão de aumento na atividade de caspase 3/7 com o aumento da quantidade de Hemina. Destaca-se o fato de que em Jurkat, atingem-se níveis significativamente maiores de ativação de caspase 3/7 no tratamento com 200 μ M hemina, com uma ampliação significativa dessa ativação com a adição do inibidor.

Os resultados obtidos para U937 (figuras 3A e 3C), nos tratamentos que empregaram quantidades crescentes de hemina, estão de acordo com a literatura, na medida em que confirmam o papel protetivo (anti-apoptótico) desempenhado pela enzima HO-1 (Kocanova *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006). Além disso, como esperado, quantidades crescentes de hemina induziram de forma dose-dependente a expressão da HO-1 (figura 10A), estando a mesma atuando de forma protetiva como indicado pela tendência à diminuição na atividade de caspase 3/7 (figura 3A e 3C). No entanto, não se observa influência do inibidor, quando o mesmo é adicionado aos tratamentos com 100 e 200 μ M de hemina. Além disso, fica claro que não se obteve uma super-expressão da HO-1 através dos tratamentos com quantidades crescentes de hemina, uma vez que os níveis de indução da expressão da enzima em 100 μ M de hemina foram de apenas aproximadamente 1,6x em relação ao controle não tratado (figura 10A). Como já citado anteriormente, Suttner and Dennery (1999) observaram citotoxicidade mediada pela HO-1, somente quando os níveis de expressão da mesma foram

superiores a 15x. Assim, podemos explicar as diferenças nos resultados obtidos envolvendo os tratamentos com restrição de soro (figuras 2A e 2C) e aqueles envolvendo quantidades crescentes de hemina (figuras 3A e 3C), destacando a importância da restrição de soro para se obter uma possível expressão acentuada da enzima HO-1. Além disso, pode se supor que a restrição de soro tenha como consequência a ativação de uma rota bioquímica diferente daquela induzida simplesmente pela adição de quantidades crescentes de hemina, sendo a primeira provavelmente capaz de levar à super-expressão da enzima HO-1.

Os níveis de ativação de caspase 3/7 obtidos para a linhagem celular Jurkat, nos tratamentos com quantidades crescentes de hemina (figuras 3B e 3D), demonstram um aumento na atividade de caspase 3/7, atingindo níveis significativamente maiores na quantidade de 200 μ M de hemina e mesmo uma ampliação significativa dessa ativação com a adição do inibidor ZnPP. O surpreendente foi o resultado obtido, em quantidades crescentes de hemina, para a expressão de HO-1 (figura 10C), onde ocorreu uma inibição dose dependente do transcrito. A hemina nada mais é que o grupo heme oxidado, sendo então empregado como substrato para a atividade das heme oxigenases. Dessa forma, este material é empregado amplamente como indutor da HO-1 e o esperado nessa circunstância seria uma indução da expressão da HO-1. Esse resultado contraditório observado pode ser a explicação para o comportamento oposto apresentado por Jurkat e U937 quando expostas a quantidades crescentes de hemina (figuras 3A-D), uma vez que estando a HO-1 inibida perde-se a atividade anti-apoptótica apresentada pela mesma, refletindo assim nos altos níveis de atividade de caspase 3/7 obtidos com 200 μ M de hemina. A inibição da expressão da HO-1, em Jurkat, em quantidades crescentes de hemina, pode ser um reflexo de um mecanismo de regulação diferenciado para HO-1 nessa linhagem celular. Zhang *et al.*, (2006) submeteram células Jurkat à hipóxia mas não foi detectada expressão de HO-1. Além disso, nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que em situações de hipóxia os níveis de expressão de HO-2 seriam regulados negativamente como uma adaptação para manter os níveis intracelulares de heme. Portanto, em algumas situações específicas de estresse diferentes mecanismos de regulação gênica devem estar atuando. Por outro lado, pode se considerar que os tratamentos com hemina estejam aumentando a atividade da enzima HO-1, e que o resultado observado na figura 10C seja o reflexo de uma regulação negativa na expressão da enzima mediada por

algum dos produtos da reação catalisada pela mesma. Srisook *et al.*, (2005) mostraram que macrófagos tratados com doses crescentes de CORM-2 (doador de CO) apresentam uma inibição dose dependente na expressão de HO-1.

Estudos demonstram que NO tem como alvo HO-1, e que os efeitos de redução de proliferação e apoptose gerados por NO em Jurkat estão associados com uma expressão aumentada de HO-1 (Pae *et al.*, 2004). Srisook *et al.*, (2005) mostraram que, em macrófagos RAW 264.7, o aumento na atividade de HO-1 é fundamental para a sobrevivência dessas células quando estimuladas com LPS. Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que uma das razões para o aumento da sobrevivência dos macrófagos tratados com LPS seria a atuação do aumento da atividade de HO-1 de forma a limitar a disponibilidade de heme essencial para a atividade das enzimas geradoras de NO (por exemplo, iNOS). Experimentos envolvendo a transferência do gene da HO-1, demonstraram que a inibição de iNOS está entre os fatores que podem interferir na diminuição da rejeição a órgãos transplantados (Coito *et al.*, 2002). Uma série de trabalhos demonstra que a resistência à toxicidade mediada por NO depende da ativação de HO-1, bem como que diferentes doadores de NO levam à ativação da expressão de HO-1 (Kwak *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 1999). Tais evidências apontaram a necessidade de testarmos o envolvimento do NO e a expressão da iNOS, relacionado a ativação de HO-1 promovido em nossos tratamentos. As quantidades de óxido nítrico detectadas nos sobrenadantes, através do Ensaio de Griess, não apresentaram grande variação seja entre os tratamentos ou entre os diferentes tempos em qualquer das linhagens celulares analisadas (figuras 4A e 4B). Tal resultado sugere que o óxido nítrico não tem participação na rota de ativação de caspase 3/7 desencadeada pelo tratamento 0,2%SFB+Hemina 20 μ M, da mesma forma que o emprego do inibidor ZnPP não provocou nenhuma alteração nos níveis de NO. Portanto, não fica demonstrada relação entre HO-1 e os níveis de NO nos sobrenadantes nos diferentes tratamentos e tempos.

Nos tratamentos com quantidades crescentes de hemina, quando analisado os níveis de NO nos sobrenadantes (figuras 5A e 5B), houve uma relação de dose-dependência, sem que ocorresse influência da adição do inibidor. Esse resultado parece entrar em conflito com os dados obtidos através da análise da quantidade do transcrito de iNOS (figura 10D), na linhagem celular Jurkat. Demonstrou-se que, para a linhagem celular Jurkat, ocorre uma

diminuição dose-dependente de iNOS com o aumento da concentração de hemina. No entanto, sabemos que a síntese de NO, promovida pela iNOS, também é resultado da atuação de outras isoformas dessa enzima, como, por exemplo, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (White and Marletta, 1992). Logo, esse aumento de NO, dose-dependente, em Jurkat, pode ser resultado da atividade de outra isoforma de NOS. Além disso, a variação na expressão de iNOS nos tratamentos com quantidades crescente de hemina ficou entre 0,4-0,5X (inibição para Jurkat e ativação para U937)(figuras 10B e 10D). Somando-se a esse resultado o fato do ZnPP não ter influenciado de forma significativa as quantidades de óxido nítrico nos sobrenadantes dos tratamentos com quantidades crescentes de hemina (figuras 5A e 5B), não fica demonstrada participação do NO ou da iNOS, na rota desencadeada por quantidades crescentes de hemina.

6. Conclusão

Os resultados aqui apresentados nos apontam as seguintes conclusões:

- a) Através dos tratamentos 0,2%SFB+Hemina(20 μ M) e 0,2%SFB+Hemina (20 μ M)+ZnPP(10 μ M) ficou demonstrado que a enzima HO-1 está exercendo um papel pró-apoptótico em ambas as linhagens celulares testadas, e que esse papel ativo da HO-1 na indução de apoptose deve-se, de acordo com a literatura, a um quadro de super-expressão da mesma.
- b) Não ficou demonstrada nos diferentes tratamentos que envolvem restrição de soro, hemina e ZnPP uma variação nas quantidades de NO detectado nos sobrenadantes, indicando que o mesmo não participa da rota desencadeada por esses tratamentos.
- c) A viabilidade celular avaliada nos tratamentos que empregaram restrição de soro, hemina e ZnPP não apresentou o mesmo padrão observado na análise da ativação de caspase3/7.
- d) A análise da morfologia das células U937 e Jurkat, indicou que as mesmas quando submetidas aos tratamentos de 0,2%SFB+Hemina(20 μ M) e 0,2%SFB+Hemina (20 μ M)+ZnPP(10 μ M), em 12h de tratamento, tiveram uma redução no tamanho e um aumento na complexidade, comportamento esse característico de células que estão em processo de apoptose.
- e) Os tratamentos que empregaram quantidades crescentes de hemina falharam ao tentar super-expressar a HO-1 em ambas as linhagens celulares e simular os efeitos pró-apoptóticos obtidos nos tratamentos que envolveram restrição de soro.
- f) Os resultados obtidos para quantidades crescentes de hemina, na linhagem celular U937, confirmaram o papel protetivo promovida pela HO-1 quando expressa em níveis intermediários, de acordo com o descrito na literatura.
- g) Os tratamentos com quantidades crescentes de hemina demonstraram, para a linhagem Jurkat, uma regulação negativa da expressão de HO-1. Tal resultado, não encontra precedente na literatura e sugere uma possível regulação diferenciada da expressão de HO-1 na linhagem celular Jurkat.
- h) Constatou-se um aumento dose-dependente das quantidades de NO quando as células U937 e Jurkat foram tratadas com quantidades crescentes de hemina. No entanto, o emprego do inibidor não resultou em alteração significativa nas quantidades de NO. Portanto, conclui-se que quantidades crescentes de hemina determinam aumento nos níveis de NO através de uma rota que não envolve a enzima HO-1.

A enzima HO-1 tem sido alvo de uma série de estudos, todos apontando para o imenso potencial terapêutico que a mesma apresenta. O papel protetivo da HO-1 é um dos aspectos que é amplamente explorado nas diferentes abordagens terapêuticas até então sugeridas tendo como alvo essa enzima. No entanto, o resultado apresentado em nosso trabalho vem se somar a vários outros da literatura indicando que muitas abordagens terapêuticas que visam induzir essa enzima em busca de seus efeitos protetivos podem induzir morte celular. Portanto, é necessário se avaliar de forma criteriosa os níveis de ativação da enzima HO-1 obtidos em qualquer abordagem terapêutica, a fim de se evitar efeitos que sejam opostos aos desejados. Além disso, essa enzima age de forma ativa na proteção de células transformadas, tornando as mesmas pouco suscetíveis a tratamentos citotóxicos. Nesse contexto, tratamentos que visam inibir a atividade da HO-1 podem aumentar a susceptibilidade das células transformadas aos tratamentos tradicionais. Com base nos resultados obtidos no nosso trabalho, podemos sugerir que abordagens clínicas que busquem super-ativar a enzima podem obter sucesso levando células transformadas a entrar em processo de morte celular programada.

7. Bibliografia:

Abraham NG, Lin JHC, Schwartzman ML, Levere RD and Shibahara S (1988) The physiological significance of heme oxygenase. *Int J Biochem* 20:543–558.

Abraham NG, Rezzani R, Rodella L, Kruger A, Taller D, Li Volti G, Goodman AI and Kappas A (2004) Overexpression of human heme oxygenase-1 attenuates endothelial cell sloughing in experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2468–2477.

Abraham, N. G., Lavrovsky, Y., Schwartzman, M. L., Stoltz, R. A., Levere, R. D., Gerritsen, M. E., Shibahara, S., and Kappas, A. (1995) Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6798–6802.

Agarwal A and Nick HS (2000) Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J Am Soc Nephrol* 11:965–973.

Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ and Nath KA (1995) Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: A protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int* 48: 1298–1307.

Ahmed A, Rahman M, Zhang X, Acevedo CH, Nijjar S, Rushton I, Bussolati B and St John J (2000) Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNF alpha-induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. *Mol Med* 6: 391–409.

Alam J and Den Z (1992) Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 267: 21894-21900.

Alcaraz MJ, Habib A, Creminon C, Vicente AM, Lebret M, Levy-Toledano S and Maclouf J (2001) Heme oxygenase-1 induction by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages is upregulated by a cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1526: 13-16.

Almeida MC, Silva AC, Barral A, Barral MN (2000) A Simple Method for Human Peripheral Blood Monocyte Isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 221-223.

Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, et al. (1999) Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Investig* 104:1631–1639.

Anderson K (1996) The porphyrias. In: Zakim D and Boyer TD (eds) *Hepatology: a textbook of liver diseases*. 3rd ed. WD Saunders, Philadelphia, pp 417– 463.

Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD and Vercellotti GM (1991) Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial cell injury. *Arterioscler Thromb* 11: 1700-1711.

Beg AA, Finco T S, Nantermet PV and Baldwin AS (1993) Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 13: 3301-3310.

Behrend M (2000) Immune-adhesion molecules in the prevention of allograft rejection and reperfusion injury. *Expert Opin Investig Drugs* 9:789–805.

Beschorner R, Adjodah D, Schwab JM, Mittelbronn M, Pedal I, Mattern R, Schluesener HJ and Meyermann R (2000) Long-Term expression of heme oxygenase-1 (ho-1, hsp-32) following focal cerebral infarctions and traumatic brain injury in humans. *Acta Neuropathol* 100: 377–384.

Bishop A, Yet SF, Lee ME, Perrella MA, Demple B (2004) A key role for heme oxygenase-1 in nitric oxide resistance in murine motor neurons and glia. *Biochem Biophys Res Commun* 325(1):3-9.

Bonkovsky HL (1990) Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias. In: Zakim D and Boyer TD (eds) *Hepatology: a textbook of liver disease*. 2nd ed. WD Saunders, Philadelphia, pp 378–424.

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, and Soares MP (2000) Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 192:1015–1026.

Camejo G, Halberg C, Manschik-Lundin A, Hurt-Camejo E, Rosengren B, Olsson H, Hansson GI, Forsberg GB and Ylhen B (1998) Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res* 39: 755-766.

Chauveau C, Remy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, Tesson L, Brion R, Beriou G, Gregoire M, Josien R, Cuturi MC and Aneon I (2005) Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106: 1694-1702.

Chen S, Kapturczak MH, Wasserfall C, Glushakova OY, Campbell-Thompson M, Deshane JS, Joseph R, Cruz PE, Hauswirth WW, Madsen KM, Croker BP, Berns KI, Atkinson MA, Flotte TR, Tisher CC and Agarwal A (2005) Interleukin 10 attenuates neointimal proliferation and inflammation in aortic allografts by a heme oxygenase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7251-7256.

Clark JE, Green CJ and Motterlini R (1997) Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway in keratinocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 215–220.

Coito AJ, Buelow R, Shen XD, Amersi F, Moore C, Volk HD, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW (2002) Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74(1):96-102.

Cosso L, Maineri EP, Traverso N, Rosatto N, Pronzato MA, Cottalasso D, Marinari UM and Odetti P (2001) Induction of heme oxygenase 1 in liver of spontaneously diabetic rats. *Free Radic Res* 34: 189–191.

Davies KJA and Delsignore M (1986) Protein damage and degradation by oxygen radicals III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 262: 9908–9913.

Deininger MH, Meyermann R, Trautmann K, Duffner F, Grote EH, Wickboldt J and Schluesener HJ (2000) Hemeoxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression. *Brain Res* 882: 1–8.

Dennery, P. A., Wong, H. E., Sridhar, K. J., Rodgers, P. A., Sim, J. E., and Spitz, D. R. (1996) Differences in basal and hyperoxia-associated HO expression in oxidant-resistant hamster fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 271, L672–L679

Dennery, P., Sridhar, K., Lee, C., Wong, H., Shokoohi, V., Rodgers, P., and Spitz, D. (1997) Heme oxygenase-mediated resistance to oxygen toxicity in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 14937–14942.

Deramautd BM, Braunstein S, Remy P and Abraham NG (1998) Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 68: 121–127.

Deshane J, Wright M and Agarwal A (2005) Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol* 52: 273-284.

Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, Shibahara S, Ogawa M and Maeda H (1999) Induction of haem oxygenase-1 by nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 80:1945–1954.

Eisenstein RS and Munro H (1990) Translational regulation of ferritin synthesis by iron. *Enzyme* 44: 42–58.

Ewing, J. F., Haber, S. N., and Maines, M. D. (1992) Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of gene. *Biochem. J.* 343–347.

Exner M, Minar E, Wagner O and Schillinger M (2004) The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 37: 1097–1104.

Fang J, Akaike T and Maeda H (2003) Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 9: 27–35.

Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD and Snyder SH (1999) Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1: 152-157.

Gerritsen ME and Bloor CM (1993) Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 7: 523-532.

Giugliano D, Ceriello A and Paolisso G (1995) Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism* 44: 363–368.

Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML and Abraham NG (1997) Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 54–61.

Granick S, Sincalir P, Sassa S and Grieninger G (1975) Effects of heme, insulin, and serum albumin on heme and protein synthesis in chick embryo liver cells cultured in a chemically defined medium, and a spectrofluorometric assay for porphyrin composition. *J Biol Chem* 250: 9215–9225.

Grimm S and Baeuerle PA (1993) The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 290: 297-308.

Guo X, Shin VY and Cho CH (2001) Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. *Life Sci* 69: 3113–3119.

Hara E, Takahashi K, Takeda K, Nakayama M, Yoshizawa M, Fujita H, Shirato K and Shibahara S (1999) Induction of heme oxygenase-1 as a response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors. *Biochem Pharmacol* 58: 227–236.

Hartsfield SL, Alam J, Cook JL and Choi AMK (1997) Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 273: 980–988.

Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, and Suematsu M (1999) Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 85:663–671.

Hunter GC, Dubick MA, Keen CL and Eskelson CD (1991) Effects of hypertension on aortic antioxidant status in human abdominal aneurysmal and occlusive disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 196: 273-279.

Ignarro LJ, Wood KS and Wolin MS (1984) Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 17:267-274.

Imagawa M, Chiu R and Karin M (1987) Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51: 251-260.

Immenschuh S, Stritzke J, Iwahara S, and Ramadori G (1999) Up-regulation of heme-binding protein 23 (HBP23) gene expression by lipopolysaccharide is mediated via a nitric oxide-dependent signaling pathway in rat Kupffer cells. *Hepatology* 30:118-127.

Ishikawa K (2003) Heme Oxygenase-1 against vascular insufficiency: roles of atherosclerotic disorders. *Curr Pharm Des* 9: 2489-2497.

Ishizaka N and Griendling KK (1997) Heme oxygenase-1 is regulated by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 29:790-795.

Ishizaka N, de Leon H, Laursen JB, Fukui T, Wilcox JN, De Keulenaer G, Griendling KK and Alexander RW (1997) Angiotensin II induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. *Circulation* 96: 1923-1929.

Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW and Balla G (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100: 879-887.

Johnson RA, Teran FJ, Durante W, Peyton KJ and Johnson, FK (2004) Enhanced heme oxygenase-mediated coronary vasodilation in dahl salt-sensitive hypertension. *Am J Hypertens* 17: 25-30.

Juan SH, Lee TS, Tseng KW, Liou JY, Shyue SK, Wu KK and Chau LY (2001) Adenovirus-Mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* 104: 1519-1525.

Jun CD, Choi BM, Hoon-Ryu, Um JY, Kwak HJ, Lee BS, Paik SG, Kim HM and Chung HT (1994) Synergistic cooperation between phorbol ester and IFN-gamma for induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 153: 3684-3690.

Kadoya C, Domino EF, Yang GY, Stern JD and Betz AL (1995) Preischemic but not postischemic zinc protoporphyrin treatment reduces infarct size and edema accumulation after temporary focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26: 1035-1038.

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

Kikuchi G and Yoshida T (1983) Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol Cell Biochem* 53/54:163–183.

Kim SW, Oh HM, Kim BS, Chung HT, Han WC, Kim EC, Kim TH, Seo GS, Lyou JH, Nah YH, Jung JC, Choi SC and Jun CD (2003) Soluble factor from tumor cells induces heme oxygenase-1 by a nitric oxide-independent mechanism in murine peritoneal macrophages. *Exp Mol Med* 35: 53-9.

Kocanova S, Buytaert E, Matroule JY, Piette J, Golab J, de Witte P, Agostinis P (2007) Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38(MAPK) and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. *Apoptosis* 12(4):731-741.

Kwak HJ, Park KM, Lee S, Lim HJ, Go SH, Eom SM, Park HY (2006) Preconditioning with low concentration NO attenuates subsequent NO-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells via HO-1-dependent mitochondrial death pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 217(2):176-184.

Lang D, Reuter S, Buzescu T, August C and Heidenreich S (2004) Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. *Int Immunol* 17: 155–165.

Larrick JW, Fischer DG, Anderson SJ, Koren HS (1980) Characterization of a human macrophage-like cell line stimulated in vitro: a model of macrophage functions. *J Immunol* 125: 6-12.

Lautier D, Luscher P, and Tyrrell RM (1992) Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 13:227–232.

Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A and Abraham NG (1994) Identification of binding sites for transcription factors NF- κ B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5987-5991.

Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B and Roy AK (2000) Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NF κ B. *Mech Ageing Dev* 114: 49-60.

Lee TS and Chau LY (2002) Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8: 240–246.

Lee TS, Tsai HL and Chau LY (2003) Induction of Heme Oxygenase-1 Expression in Murine Macrophages is Essential for the Anti-inflammatory Effect of Low Dose 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. *J Biol Chem* 278: 19325-19330.

Li L, Hamilton RF Jr, and Holian A (2000) Protection against ozone-induced pulmonary inflammation and cell death by endotoxin pretreatment in mice: role of HO-1. *Inhal Toxicol* 12:1225-1238.

Li X and David Clark J (2000) Chronic morphine exposure and the expression of heme oxygenase type 2. *Brain Res Mol Brain Res* 75:179-184.

Li YX, Li G, Dong WP, Lu DR, Tan JM (2006) Protection of human islets from induction of apoptosis and improved islet function with HO-1 gene transduction. *Chin Med J* 119(19):1639-1645.

Lin, J. H., Villalon, P., Martasek, P., and Abraham, N. G. (1990) Regulation of heme oxygenase gene expression by cobalt in rat liver and kidney. *Eur J Biochem.* 192, 577-582.

Liou HC and Baltimore D (1993) Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* 5: 477-487.

Liu XM, Chapman GB, Wang H and Durante W (2002) Adenovirusmediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 105:79-84.

Lopez-Hernandez FJ, Ortiz MA, Piedrafita FJ (2006) The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are differentially affected by temperature upstream of mitochondrial damage. *Apoptosis* (Epub ahead of print).

Lum H and Roebuck KA (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C719-741.

Luscher B, Mitchell PJ, Williams T and Tjian R (1989) Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev* 3: 1507-1517.

Maines MD (1988) Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557-2568.

Maines MD (1992) Heme oxygenase: clinical applications and functions. Boca Raton: CRC Press, New York, 234pp.

Maines MD (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:517-554.

Maines MD and Panahian N (2001) The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol* 502:249–272.

Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, and McLaughlin BE (1991) Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol Sci* 12:185–188.

Maruhashi K, Kasahara Y, Ohta K, Wada T, Ohta K, Nakamura N, Toma T, Koizumi S and Yachie A (2004) Paradoxical Enhancement of Oxidative Cell Injury by Overexpression of Heme Oxygenase-1 in an Anchorage-Dependent Cell ECV304. *J Cell Biochem* 93(3): 552-562.

Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M, Marculescu R, Printz D, Fritsch G, Wagner O, Selzer E, Sperr WR, Valent P and Sillaber C (2004) Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 64: 3148-3154.

McCoubrey WK Jr, Huang TJ and Maines MD (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725–732.

Miller YI and Shaklai N (1994) Oxidative crosslinking of LDL protein induced by hemin: involvement of tyrosines. *Biochem Mol Biol Int* 34: 1121-1129.

Mitani K, Fujita H, Fukuda Y, Kappas A and Sassa S (1993) The role of inorganic metals and metalloporphyrins in the induction of heme oxygenase and heat-shock protein 70 in human hepatoma cells. *Biochem J* 290: 819–825.

Mitani K, Fujita H, Kappas A, and Sassa, S (1992) Heme oxygenase is a positive acute-phase reactant in human Hep3B hepatoma cells. *Blood* 79: 1255-1259.

Mitchell P J, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PW and Tjian R (1991) Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5: 105-119.

Moore MR (1998) The biochemistry of heme synthesis in porphyria and in the porphyrias. *Clin. Dermatol.* 16:203–223.

Morita T and Kourembanas S (1995) Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Investig* 96:2676–2682.

Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE and Green CJ (2000) Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric oxide synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 275: 13613–13620.

Nath KA (1999) Heme oxygenase-1: a redoubtable response that limits reperfusion injury in the transplanted adipose liver. *J Clin Investig* 104:1485–1486.

Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD and Rosenberg ME (1992) Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90: 267–270.

Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya CV, Manivel JC, Haggard JJ, Croatt AJ, Payne WD, and Alam J (2001b) Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int* 59:106–117.

Neuzil J and Stocker R (1993) Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett* 331: 281–284.

Neuzil J and Stocker R (1994) Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269: 16712–16719.

Neuzil J, Gebicki J, and Stocker R (1993) Radical induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain breaking antioxidants. *Biochem J* 293:601–606.

Nolan GP, Fujita T, Bhatia K, Huppi C, Liou HC, Scott ML and Baltimore D (1993) The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 13: 3557-3566.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, and Choi AM (2000) Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6:422–428.

Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, Liu F, Song R, Usheva A, Stachulak C, Bodyak N, Smith RN, Csizmadia E, Tyagi S, Akamatsu Y, Flavell RJ, Billiar TR, Tzeng E, Bach FH, Choi AM, Soares MP (2003) Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 9: 183-190.

Patel K, Bhaskaran M, Dani D, Reddy K and Singhal PC (2003) Role of Heme Oxygenase-1 in Morphine-Modulated Apoptosis and Migration of Macrophages. *J Infect Dis* 187:47–54.

Pellacani A, Wiesel P, Sharma A, Foster LC, Huggins GS, Yet SF, and Perrella MA (1998) Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor-beta1. *Circ Res* 83:396–403.

Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, and Choi AM (2000) Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L312–L319.

Poss KD and Tonegawa S (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10919–10924.

Rizzardini, M., Terao, M., Falciani, F., and Cantoni, L. (1993) Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver. Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase mRNA and protein. *J. Neurochem.* 58, 1140–1149.

Ryter SW and Tyrrell RM (1997) The role of heme oxygenase-1 in the mammalian stress response: molecular aspects of regulation and function. In: Forman HJ and Cadenas E (eds) *Oxidative stress and signal transduction*. 1st ed. Chapman and Hall, New York, pp 343–386.

Ryter SW And Tyrrell RM (2000) The Heme Synthesis And Degradation Pathways: Role In Oxidant Sensitivity. *Free Radic Biol Med* 28: 289-309.

Sarady JK, Otterbein SL, Liu F, Otterbein LE, and Choi AM (2002) Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colonystimulating factor in macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:739–745.

Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Seigny J, Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FH and Soares MP (2001) Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 166: 4185–4196.

Schacter B (1988) Heme catabolism by heme oxygenase, physiology, regulation, and mechanism of action. *Semin Hematol* 25:349–369.

Schillinger M, Exner M, Minar E, Mlekusch W, Mullner M, Mannhalter C, Bach FH and Wagner O (2004) Heme Oxygenase-1 genotype and restenosis after balloon angioplasty: a novel vascular protective factor. *J Am Coll Cardiol* 43: 950–957.

Shibahara S (1988) Regulation of heme oxygenase gene expression. *Semin Hematol* 25: 370–376.

Simizu S, Takada M, Umezawa K and Imoto M (1998) Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 273: 26900–26907.

Singhal PC, Kapasi AA, Franki N and Reddy K (2000) Morphine-induced macrophage apoptosis: the role of transforming growth factor- β . *Immunology* 100: 57-62.

Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, Reddy K, Franki N and Gibbons N (1998) Morphine Enhances Macrophage Apoptosis. *J Immunol* 160: 1886–1893.

Siow RC, Sato H and Mann GE (1999) Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: Anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res* 41: 385–394.

Smith MA, Kutty RK, Richey PL, Yan SD, Stern D, Chader GJ, Wiggert B, Petersen RB and Perry G (1994) Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 145: 42–47.

Snape AM, Winning RS and Sargent TD (1991) Transcription factor AP-2 is tissue-specific in *Xenopus* and is closely related or identical to keratin transcription factor 1 (KTF-1). *Development* 113: 283-293.

Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, et al. (1998) Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 4:1073–1077.

Song R, Mahidhara RS, Liu F, Ning W, Otterbein LE and Choi AM (2002) Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 603-610.

Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, Hoffman RA, Seol DW, Flavell RA, Billiar TR, Otterbein LE and Choi AM (2004) Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol* 172: 1220-1226.

Song R, Ning W, Liu F, Ameredes BT, Calhoun WJ, Otterbein LE, and Choi AM (2003) Regulation of IL-1 β -induced GM-CSF production in human airway smooth muscle cells by carbon monoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L50–L56.

Song W, Su H, Song S, Paudel HK, Schipper HM (2006) Over-expression of heme oxygenase-1 promotes oxidative mitochondrial damage in rat astroglia. *J Cell Physiol* 206(3):655-663.

Srisook K, Han SS, Choi HS, Li MH, Ueda H, Kim C, Cha YN (2005) CO from enhanced HO activity or from CORM-2 inhibits both O₂- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochem Pharmacol* 71:307-18.

Stocker R (1990) Induction of heme oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 9: 101–112.

Stocker R and Ames B (1987b) Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in the bile. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8130–8134.

Stocker R and Peterhans E (1989a) Synergistic interaction between vitamin E and the bile pigments bilirubin and biliverdin. *Biochim Biophys Acta* 1002: 238–244.

Stocker R and Peterhans E (1989b) Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin: biologically relevant scavenging of hypochlorous acid. *Free Radic Res Commun* 6: 57–66.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh A, Glazer A and Ames BN (1987a) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043–1045.

Suttner DM and Dennery PA (1999) Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 13: 1800–1809.

Takahashi K, Nakayama M, Takeda K, Fujia H, and Shibahara S (1999) Suppression of heme oxygenase-1 mRNA expression by interferon-gamma in human glioblastoma cells. *J Neurochem* 72:2356–2361.

Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y and Maeda H (2003) Antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumor. *Br J Cancer* 88: 902–909.

Terry MJ, Linley PJ, and Kohchi T (2002) Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans* 30:604–609.

Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, and Morrison AR (1995) Regulation of heme oxygenase mRNA in mesangial cells: prostaglandin E2 negatively modulates interleukin-1-induced heme oxygenase-1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 212:617–623.

Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M and Ono M (2000) Coexpression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res* 91: 906–910.

Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, Toyooka H and Yoshida H (1999) Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 138: 53–59.

Tubaro E, Borelli G, Croce C, Cavalio G, and Santiangeli C (1983) Effect of morphine on resistance to infection. *J Infect Dis* 148:656.

Tulis DA, Durante W, Liu X, Evans AJ, Peyton KJ and Schafer AI (2001) Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene delivery inhibits injury-induced vascular neointima formation. *Circulation* 104: 2710–2715.

Vicente AM, Guillen MI and Alcaraz MJ (2003) Participation of Heme Oxygenase-1 in a Model of Acute Inflammation. *Exp Biol Med* 228:514–516.

Vogt BA, Shanley TP, Croatt A, Alam J, Johnson KJ, and Nath KA (1996) Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury. *J Clin Investig* 98:2139–2145.

Wagener FADTG, da Silva JL, Farley T, de Witte T, Kappas A, and Abraham NG (1999) Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediated endothelial ICAM-1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 291:416–423.

Wagener FADTG, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T, and Figdor CG (2001) Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98:1802–1811.

Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC and Chau LY (1998) Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 152: 711–720.

Wang YF, Tian H, Tang CS, Jin HF, Du JB (2007) Nitric oxide modulates hypoxic pulmonary smooth muscle cell proliferation and apoptosis by regulating carbon monoxide pathway. *Acta Pharmacol Sin* 28(1):28-35.

White KA and Marletta MA (1992) Nitric oxide synthase is a cytochrome p-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 31: 6627–6631.

Willis D, Moore AR, and Willoughby DA (2000) Heme oxygenase isoform expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat. *J Pathol* 190:627–634.

Willis D, Moore AR, Frederick R and Willoughby DA (1996) Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2: 87–90.

Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S and Sasaki H (2000) Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 66: 187–195.

Yet, S. F., Pellacani, A., Patterson, C., Tan, L., Folta, S. C., Foster, L., Lee, W. S., Hsieh, C. M., and Perrella, M. A. (1997) Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. A link to endotoxic shock. *J. Biol. Chem.* 272, 4295–4301.

Zamora R, Vodovotz Y, Aulak KS, Kim PK, Kane JM 3rd, Alarcon L, Stuehr DJ and Billiar TR (2002) A DNA microarray study of nitric oxide-induced genes in mouse hepatocytes: Implications for hepatic hemeoxygenase-1 expression in ischemia/reperfusion. *Nitric Oxide* 7: 165–186.

Zhang Y, Furuyama K, Kaneko K, Ding Y, Ogawa K, Yoshizawa M, Kawamura M, Takeda K, Yoshida T, Shibahara S (2006) Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. *FEBS J* 273(14):3136-3147.

Zou MH, Shi C and Cohen RA (2002) High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin

h(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes* 51: 198–203.