Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho

Efeito do BAY 41-2272 em Linfócitos T Humanos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2018

Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho

Efeito do BAY 41-2272 em Linfócitos T Humanos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Versão original

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Uchôa Wall Barbosa de Carvalho, Marina
Efeito do BAY 41-2272 em Linfócitos T Humanos /
Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho; orientador
Antonio Condino Neto. -- São Paulo, 2018.
99 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Bay 41-2272. 2. Guanilato Ciclase Solúvel. 3.
Linfócitos T. 4. GMPc. I. Condino Neto, Antonio,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho

Título da Tese: Efeito do BAY 41-2272 em Linfócitos T Humanos

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ____/____/____, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 01 de outubro de 2013.

PARECER 1142/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na reunião realizada no dia 25.09.2013, APROVOU o projeto intitulado: "*Efeito do BAY 41-2272, agonista da enzima Guanilato Ciclase, em Linfócitos T CD4+ e Células Jukart*" do pesquisador **ANTONIO CONDINO NETO** e aluna **MARINA UCHÔA WALL BARBOSA DE CARVALHO**.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c. conforme modelo constante no site.icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25.09.2014**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho...

... à Deus e, principalmente, Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, principal motivo de tudo que alcancei.

... aos meus pais, Cacá e Rosa, Carlos Filho e meu noivo Renan que dignamente me apresentaram a importância da família e da cumplicidade e sempre apoiaram as minhas decisões. Amo vocês!

... à minhas amadas filhas, pois quando elas surgiram o mundo ganhou outro sentido e por elas ganhei a força para realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Condino, pela ajuda na orientação deste estudo e na construção de alicerces profissionais sólidos, e, principalmente, pela oportunidade concedida.

À família LIH em especial Chris, Sil, Nuria, Lucila, Tábata, Christiane e Renata por sempre me encorajarem e terem uma palavra de apoio.

À Paola, por ser mais que uma companheira de laboratório, sem dúvidas os anos de doutorado não seriam os mesmos sem nossas noites e finais de semana juntas no laboratório.

Aos que já fizeram parte da família LIH e que estão sempre presentes Mateo, Caru, Angela, Paulo Vítor, Marília, Walmir, Josias, Otávio e Lena, pelas conversas, conselhos, e, principalmente, por me receberem tão bem quando eu cheguei em São Paulo.

Aos amigos, em especial Day, Dani, Mari, Samuel, Carlinha e Mara pela amizade, solidariedade e encorajamento ao longo dessa trajetória.

Aos Eni, João e Celso por sempre tirarem todas as minhas dúvidas.

Ao pessoal da portaria em especial, Miltão e Otacílio, por sempre me fazerem rir assim que chego no departamento.

A Aurea pelo cuidado e pelo seu café maravilhoso.

A FAPESP pelo apoio financeiro concedido, sem o qual não haveria possibilidade da realização desta tese.

E à todos que de forma direta ou indireta ajudaram na confecção deste trabalho.

RESUMO

Carvalho MUWB. **Efeito do BAY 41-2272 em linfócitos T humanos**. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

No presente trabalho avaliamos o potencial do BAY 41-2272 e sua via, como uma ferramenta para modulação da função dos linfócitos. Para isso, realizamos tratamentos farmacológicos com BAY 41-2272, avaliando a produção de citocinas e observamos que este fármaco, como ativador direto, não induz produção de IFN γ , IL-4 e IL-10 nos linfócitos. No entanto, o pré-tratamento por 24 horas com BAY 41-2272, com posterior ativação com PMA, mostrou que esta droga tem efeito inibitório na produção das citocinas. Em vista disto, avaliamos se este fármaco seria capaz de ativar estas células através da expressão de CD69. Vimos que por si só esta droga não foi capaz de aumentar a expressão de CD69, no entanto o pré-tratamento com BAY 41-2272 inibiu a ativação dos linfócitos T CD4. Assim, avaliamos se o fármaco seria capaz de inibir a expressão de fatores de transcrição FOXP3, ROR γ T, Tbet e GATA3. Vimos que o BAY 41-2272 não induziu expressão desses fatores de transcrição e o pré-tratamento com este fármaco não alterou a expressão de FOXP3, ROR γ T e GATA3, mas inibiu a expressão de Tbet quando comparado ao estimulado com PMA e Ionomicina sem o pré-tratamento. Observamos também que o pré-tratamento com BAY 41-2272 inibiu a linfoproliferação. Estes resultados sugerem que o BAY 41-2272 e sua via, têm um perfil inibitório sobre os linfócitos T CD4, e potencialmente podem ser utilizados como imunomodulador em pacientes com comprometimento do sistema imunológico e síndromes linfoproliferativas.

Palavras-chave: BAY 41-2272, linfócitos, guanilato ciclase solúvel

ABSTRACT

Carvalho MUWB. Effect of BAY 41-2272 in human T lymphocytes. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

In this work, we evaluated the potential of BAY 41-2272 and its pathway as a tool for modulating lymphocyte function. For this, we performed pharmacological treatments with BAY 41-2272, evaluating the production of cytokines and observed that this drug, as a direct activator, does not induce production of IFN γ , IL-4 e IL-10. However, pre-treatment for 24 hours with BAY 41-2272 and subsequente activation with PMA showed that this drug has an inhibitory effect on cytokine production. Thus, we evaluated if this drug would be able to activate these cells through the CD69 expression. We saw that alone, BAY 41-2272 was not able to increase CD69 expression, however, pre-treatment inhibited activation of CD4 T lymphocytes. Then, we evaluated if this chemical compound would be able to inhibit the expression of transcription factors FOXP3, ROR γ T, Tbet and GATA3. We have seen that BAY 41-2272 did not induce expression of these transcription factors and pre-treatment with this drug did not alter expression of FOXP3, ROR γ T and GATA3, but inhibited Tbet expression. We also observed that pre-treatment with BAY 41-2272 inhibited lymphoproliferation. These results suggest that BAY 41-2272 and its pathway have an inhibitory profile on CD4 T lymphocytes and can potentially be used as an immunomodulator in patients with impaired immune system and lymphoproliferative syndromes.

Keywords: BAY 41-2272, lymphocytes, soluble guanylate cyclase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Via de sinalização NO/GMPc	23
Figura 2 Estrutura do BAY 41-2272	24
Figura 3 Sequência de experimentos realizados com o material humano	30
Figura 4 Esquema representativo dos tratamentos utilizados para avaliar a produção de citocinas	34
Figura 5 Esquema representativo dos tratamentos utilizados para avaliar a expressão de CD69	35
Figura 6 Esquema representativo dos tratamentos utilizados para avaliar a expressão de CD25	36
Figura 7 Esquema representativo dos tratamentos utilizados para avaliar a expressão de FOXP3, ROR γ T, T-bet e GATA3	37
Figura 8 Liberação de Interferon γ por Linfócitos após estímulo com DMSO	42
Figura 9 Ensaio de Viabilidade Celular	43
Figura 10 Liberação de Interferon- γ por linfócitos por 24 horas	44
Figura 11 Liberação de Interferon- γ por linfócitos por 48 horas	45
Figura 12 Liberação de IL-4 por linfócitos por 24 horas	46
Figura 13 Liberação de IL-4 por linfócitos por 48 horas	47
Figura 14 Liberação de IL-10 por linfócitos por 24 horas	48
Figura 15 Liberação de IL-10 por linfócitos por 48 horas	48
Figura 16 Liberação de IFN- γ por linfócitos, por 24 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272	50
Figura 17 Liberação de IFN- γ por linfócitos, por 48 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272	51
Figura 18 Liberação de IL-4 por linfócitos, por 24 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272	52
Figura 19 Liberação de IL-4 por linfócitos, por 48 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272	53
Figura 20 Liberação de IL-10 por linfócitos, por 24 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272	54
Figura 21 Liberação de IL-10 por linfócitos por 48 horas	55

Figura 22 Liberação de Interferon- γ por Linfócitos por 24 horas	56
Figura 23 Liberação de Interferon- γ por linfócitos após pré-tratamento com BAY 41-2272 com posterior ativação com 90nM de PMA	58
Figura 24 Liberação de Interferon- γ por linfócitos após pré-tratamento com BAY 41-2272 com posterior ativação com 30nM de PMA	59
Figura 25 Expressão de CD69	60
Figura 26 Expressão de CD69 em linfócitos T CD3 ⁺	61
Figura 27 Expressão de CD69 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas na população de linfócitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺	63
Figura 28 Expressão de CD69 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas na população de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺	64
Figura 29 Expressão de FOXP3 e ROR γ T	65
Figura 30 Expressão de FOXP3 em linfócitos T CD3 ⁺	66
Figura 31 Expressão de ROR γ T em linfócitos T CD3 ⁺	66
Figura 32 Expressão de FOXP3 em linfócitos T CD4 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas	68
Figura 33 Expressão de FOXP3 em linfócitos T CD8 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas	69
Figura 34 Expressão de ROR γ T em linfócitos T CD4 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas	71
Figura 35 Expressão de ROR γ T em linfócitos T CD8 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas	72
Figura 36 Expressão de CD25 em linfócitos T CD4+ tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas	73
Figura 37 Expressão de CD25 em linfócitos T CD4+ após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas	74
Figura 38 Produção de GMPC em linfócitos após tratamento com BAY 41-2272	75
Figura 39 Expressão de Tbet em linfócitos T	76
Figura 40 Expressão de GATA3 em linfócitos	78
Figura 41 Ensaio de linfoproliferação	79
Figura 42 Expressão de CD69	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tratamentos utilizados para os ensaios	31
Tabela 2 Perfil fenotípico das amostras estudadas	80

LISTA DE ABREVIATURAS

TCR (do inglês, *T Cell Receptor*)

MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)

ITAM (*Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motifs*)

ZAP-70 (do inglês, *Zeta-chain-Associated Protein kinase 70*)

LAT (do inglês, *Linker of Activated T cells*)

SLP-76 (do inglês, *SH2 domain containig Leukocyte Protein of 76kDa*)

Th (do inglês, *T helper*)

IFN- γ (do inglês, *interferon-gamma*)

NK (do inglês, *Natural Killer*)

IL-12 (interleucina 12)

IL-4R (receptor de IL-4)

TGF- β (do inglês, *Tumor growth factor β*)

CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico)

GITR (do inglês, *glucocorticoid-induced TNF receptor Family-related gene*)

APC (célula apresentadora de antígeno)

CVID (do inglês *Common Variable Immunodeficiency*)

SCID (do inglês *Severe Combined Immunodeficiency*)

γ_c (gamma comum)

CD40L (CD40 Ligante)

XLP (Síndrome Linfoproliferativa ligada ao X)

IPEX (do inglês, *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked*)

APECED (do inglês, *Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis, ectodermal dysplasi*

GCs (guanilato ciclase solúvel)

NO (óxido nítrico)

PDEs (fosfodiesterases)

PMA (do inglês, *phorbol miristate acetate*)

IDPs

PKG (do inglês, *protein kinase G*)

LISTA DE FÓRMULAS

BAY 41-2272 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine

O_2^- ânion superóxido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Imunidade Adaptativa	17
1.2 Linfócitos T CD4 ⁺	17
1.3 Linfócitos T CD8 ⁺	29
1.4 Imunodeficiências primárias (IP) dos Linfócitos T	21
1.5 Via da Guanilato Ciclase Solúvel e BAY 41-2272	22
1.6 Guanilato ciclase solúvel e Linfócitos	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 Algoritmo de experimentação	30
3.2 Obtenção de Linfócitos do Sangue Periférico	30
3.3 Tratamentos Farmacológicos	31
3.4 Viabilidade por Live/Dead	32
3.5 Avaliação da Ativação Celular	32
3.5.1 Produção de citocinas	32
3.5.2 Expressão de CD69	34
3.6 Expressão de CD25	35
3.7 Expressão de FOXP3, RORγT, T-bet e GATA3	36
3.8 Dosagem de GMPc	38
3.9 Linfoproliferação	38
3.10 Imunofenotipagem	39
3.11 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
5 DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93

1.1 Imunidade Adaptativa

O sistema imune está envolvido na proteção e defesa do hospedeiro contra diversos patógenos. Tanto os mecanismos da imunidade inata, quanto os da imunidade adaptativa detectam e eliminam microrganismos patogênicos, e nesses mecanismos está incluído a discriminação do próprio e não-próprio. A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa contra microrganismos, consistindo de mecanismos eficientes de resposta antes do estabelecimento de uma infecção. Esses mecanismos reconhecem estruturas comuns a grupos de microrganismos semelhantes, não distinguindo discretas diferenças entre substâncias estranhas. Em contraste, a imunidade adquirida é capaz de reconhecer, distinguir e reagir especificamente aos diferentes microrganismos, toxinas ou alérgenos (Chaplin DD, 2010).

A imunidade adquirida tem como principais células os linfócitos, que conferem mecanismos mais versáteis de defesa e maior nível de proteção contra reinfecções pelo mesmo agente (Turvey SE, Broide DH, 2010). Os linfócitos B são responsáveis pelo desenvolvimento da resposta humoral, mediada pelos anticorpos, e os linfócitos T são responsáveis pela resposta imune mediada por células.

A principal classe de linfócitos T são os que expressam o TCR $\alpha\beta$ (do inglês, *T Cell Receptor*). Este receptor reconhece os peptídeos associados ao MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe I ou II e está expresso nos linfócitos T CD8⁺ (T citotóxicos ou CTL) e nos linfócitos T CD4⁺ (T auxiliares ou T *helper*) (Chaplin DD, 2010).

1.2 Linfócitos T CD4+

Os linfócitos T consistem de populações funcionalmente diferentes e as melhor caracterizadas são as células T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺), os linfócitos T citotóxicos (CD3⁺/CD8⁺) e as células T reguladoras (CD3⁺/CD25^{high}). A completa ativação do linfócito T ocorre através de dois sinais: primeiro pelo reconhecimento do complexo peptídeo-MHC,

apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), pelo receptor de linfócito T (TCR/CD3), específico para o antígeno apresentado; e segundo pela interação de moléculas co-estimuladoras B7 (CD80 e CD86) expressas pelas APCs com seu ligante nos linfócitos T (CD28) (Bonilla FA, Oettgen HC, 2010).

A porção citoplasmática de cada cadeia de CD3 contem motivos ITAM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motifs*), que quando fosforilados pelas quinases associadas ao receptor Lck e Fyn, iniciam uma cascata de ativação envolvendo proteínas ZAP-70 (do inglês, *Zeta-chain-Associated Protein kinase 70*), LAT (do inglês, *Linker of Activated T cells*) e SLP-76 (do inglês, *SH2 domain containig Leukocyte Protein of 76kDa*) que levam a ativação de distintas vias incluindo a cascata Ras/ERK MAPK (do inglês, *mitogen-associated protein kinases*), a via do Cálcio/calcineurina/NF-AT e via da PKC/NF-kB. Este complexo de ativação leva a expressão de genes que controlam a proliferação e diferenciação dos linfócitos T (Nakayama T, Yamashita M, 2010).

Os linfócitos T CD4⁺ são classificados funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem. Após a ativação, há um direcionamento da resposta efetora dos linfócitos T CD4⁺ para subtipos de linfócitos já descritos na literatura: Th (do inglês, *T helper*) 1, Th2, Th17 ou Treg (T reguladora), de acordo com as citocinas secretadas.

Os linfócitos CD4⁺ Th1 são caracterizados pela produção de interferon-gama (IFN- γ), que induz a ativação de fagócitos mononucleares, células NK (do inglês, *Natural Killer*) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), envolvidos na proteção do hospedeiro contra uma variedade de patógenos, principalmente por organismos intracelulares (Bonilla FA, Oettgen HC, 2010; Cope A et al, 2011). A interleucina 12 (IL-12), produzida principalmente pelas células dendríticas, é a principal citocina que dirige a polarização para Th1 e atua através do fator de transcrição STAT4 associado ao fator de transcrição T-bet. O T-bet está envolvido com a remodelação da cromatina de genes específicos para a resposta Th1 (Murphy KM, Reiner SL, 2002; Oestreich KJ, Weinmann AS, 2012).

A células CD4⁺ Th2 são importantes para a produção de anticorpos, e diversos aspectos das respostas imunes contra parasitas extracelulares e

hipersensibilidades, incluindo eosinofiloiose (Bonilla FA, Oettgen HC, 2010). A diferenciação para Th2 acontece quando os linfócitos T CD4⁺ naïves são ativados por antígenos na presença de IL-4. A sinalização do receptor de IL-4 (IL-4R) induz a fosforilação do fator de transcrição STAT6, que dimeriza e transloca para o núcleo ativando a transcrição de genes específicos para Th2, principalmente o GATA3 considerado o principal regulador de células Th2. O STAT3 também está envolvido na diferenciação Th2, atuando através da ligação aos *loci* gênicos associados a célula Th2 e cooperando com o STAT6 para polarização Th2 (Stritesky GL et al., 2011)

A polarização para células T CD4⁺ Th17 ocorre em resposta a bactérias extracelulares e fungos, e auxilia no recrutamento dos neutrófilos para eliminação desses patógenos. A resposta Th17 induz a produção de citocinas da família IL-17 (IL-17A-F) e IL-22 (Romagnani S et al., 2009). A presença de TGF- β (do inglês, *Tumor growth factor* β) em associação com IL-6, produzido por células dendríticas (ativadas por produtos microbianos ou IL-21), induz a expressão do fator de transcrição ROR γ T, que é característico dessas células (Lee YK et al., 2009). A via Th17 é inibida por IFN- γ , citocina da via Th1, bem como por IL-4, citocina da via Th2 (Lee YK et al., 2009).

Um outro grupo de células T são as células T reguladoras (Treg, CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺). Estas células estão envolvidas na manutenção da tolerância periférica através da supressão da ativação e expansão de células T autoreativas (Gorantla VS et al, 2010). As células T reg atuam através da produção de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β , indução de morte por citólise dependente de granzima A, granzima B e perforina, privação de AMPc e supressão da maturação das células dendríticas (Vignali DAA et al., 2008). Existem dois tipos de células Treg: células Treg naturais que se desenvolvem no timo e expressam constitutivamente a cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25), antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), o *glucocorticoid-induced TNF receptor Family-related gene* (GITR) e Foxp3; e células Treg induzidas, são células T efetoras que foram convertidas em Treg durante o processo inflamatório nos tecidos periféricos e possuem uma especificidade restrita para tipos particulares de células, tumores e antígenos estranhos (Gorantla VS et al., 2010).

1.3 Linfócitos T CD8⁺

Além dos linfócitos T CD4⁺ existem também os linfócitos citotóxicos ou citolíticos (CTLs, CD8⁺). Este tipo de linfócito representa a principal fração das células T e atuam na remoção de células infectadas por patógenos intracelulares e células mutadas. Estas células são ativadas quando seu TCR reconhece o complexo peptídeo-MHC classe I, presente na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Assim como as células T CD4⁺, apenas a estimulação pelo TCR não induz a ativação ideal e se faz necessário um segundo sinal co-estimulatório para a completa ativação (interação de CD28 e CD80/CD86) (Strioga M et al., 2011).

A ativação das células T CD8⁺ naíves induz a proliferação e a diferenciação em linfócitos T citolíticos (CTL), que sofrem apoptose após cumprir suas funções efectoras, e células T CD8⁺ de memória, que são geradas em quantidades pequenas e atuam em uma subsequente exposição ao mesmo antígeno, gerando uma resposta mais rápida e agressiva (Strioga M et al., 2011).

O reconhecimento de peptídeos citosólicos da célula alvo pelas CTLs em um contexto TCR / MHC classe I leva a formação de uma sinapse imunológica. Após alguns minutos, as CTLs ativam a cascata da apoptose na células alvo, processo o qual envolve a rápida mobilização de grânulos das células CTLs para a sinapse seguido pela fusão dos grânulos com a membrana plasmática das células alvo e exocitose do conteúdo granular, como granzimas e perforinas. As granzimas induzem a ativação da apoptose e em paralelo a via pró-apoptótica, a ativação do TCR na sinapse imunológica leva a expressão de Fas ligante nas CTLs, que se liga a Fas na células alvo, direcionando mais uma vez a apoptose (Bonilla FA, Oettgen HC, 2010).

Assim como ocorre nos linfócitos T CD4⁺, a natureza e a intensidade dos sinais gerados pela estimulação antigênica, regula os programas gênicos que determinam os diversos fenótipos dos linfócitos T CD8⁺. Além dos sinais já citados, o micro-ambiente de citocinas também contribui para a diferenciação das células T CD8⁺. Dessa forma, a diferenciação para o

subtipo Tc1 (T citotóxico 1) deve-se a expressão de T-bet induzida por IL-12, e para Tc2 devido a indução da expressão de GATA3 por IL-4. A célula Tc17 é gerada pela indução de ROR γ t por TGF- β associado a IL-6, IL-21 e IL-23, e para Treg acontece através da indução de Foxp3 por IL-2 (Shrikant PA et al., 2010; Saxena A et al., 2011).

1.4 Imunodeficiências primárias (IP) dos Linfócitos T

As imunodeficiências primárias representam erros congênitos do sistema imune que predisõem a infecções recorrentes e/ou crônicas, autoimunidade, alergia, câncer e outras manifestações de desregulação imunológica (Dropulic, 2011). Estas doenças podem envolver elementos da imunidade inata como os fagócitos mononucleares, polimorfonucleares, células NK e proteínas do sistema complemento, ou da imunidade adquirida, como os linfócitos T e B.

Os defeitos moleculares nas células T levam ao desenvolvimento de diversas doenças e predisõem a um amplo espectro de infecções. Algumas das imunodeficiências primárias mais comuns e severas interferem com a imunidade adaptativa, como a imunodeficiência comum variável (CVID, do inglês *Common Variable Immunodeficiency*) e imunodeficiência combinada grave (SCID, do inglês *Severe Combined Immunodeficiency*) (Turvey SE, Bonilla FA e Junker AK, 2009).

As SCID são doenças com defeitos genéticos variados que levam a falhas na maturação dos linfócitos T e, adicionalmente, o bloqueio da diferenciação dos linfócitos B e/ou células NK. Esta doença é comumente causada por uma mutação na cadeia γ_c (gamma comum), componente essencial do receptor da interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, gerando uma falha no desenvolvimento das células T e células NK (Fischer A, Hacein-Bey-Abina S e Cavazzana-Calvo M, 2010). A deficiência da cadeia gamma comum (SCID-X1) corresponde a 40 a 50% dos casos.

Existem também a síndrome de Hiper-IgM (HIGM), um grupo de desordens genéticas caracterizadas por níveis elevados ou normais de IgM no soro e baixos níveis de IgG, IgA e IgE com números normais de células B. A variante mais comum é a Hiper IgM ligada ao X (XHIGM), corresponde a

65% a 70% dos casos e resulta do defeito no CD40 Ligante (CD40L) (Tsai HY et al, 2015).

Algumas doenças específicas das células T resultam em uma susceptibilidade a um patógeno em particular como Síndrome Linfoproliferativa ligada ao X (XLP), a qual resulta em uma falha no controle da proliferação das células T ou NK ativadas que surgem após infecção do vírus Epsein-Barr (EBV) (Dropulic LK e Cohen JI, 2011).

Manifestações autoimunes também apresentam um componente relacionado às imunodeficiências primárias. A síndrome IPEX (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked*) e a APECED (*Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis, ectodermal dysplasia*) são exemplos dessas doenças. A síndrome IPEX é resultante da deficiência do fator de transcrição FOXP3, que está envolvido na regulação da resposta imune aos antígenos próprios. A APECED resulta da deficiência da proteína AIRE, responsável pela seleção negativa dos linfócitos T no timo, gerando uma autoimunidade e susceptibilidade aumentada a candidíase (Gupta S, Louis AG, 2013).

A mal formação ou ausência do timo leva a um defeito na maturação dos linfócitos T. A síndrome de Di George tem como uma das suas características a hipoplasia tímica, que resulta em imunodeficiência celular, além de defeitos humorais também descritos (Fomin ABF et al., 2010).

Apesar dos avanços obtidos na caracterização e diagnóstico, essas doenças ainda representam um desafio. O diagnóstico correto e precoce, além do tratamento adequado contribuem para um melhor prognóstico dos casos.

1.5 Via da Guanilato Ciclase Solúvel e BAY 41-2272

Nosso grupo tem se dedicado ao estudo de novas terapias ou drogas com potencial terapêutico para os pacientes com imunodeficiências primárias ou outras imunopatologias. Recentemente, demonstramos que o BAY 41-2272, um agonista de guanilato ciclase solúvel (GCs), tem se mostrado eficaz na modulação de células do sistema imunológico, levando ao controle de infecções.

A guanilato ciclase solúvel (GCs) é uma enzima de transdução de sinal amplamente distribuída que, sob a ativação pelo óxido nítrico (NO), leva ao acúmulo do segundo mensageiro GMPc. Este, regula diferentes aspectos da função celular via interação com diversas quinases, canais de íons e fosfodiesterases (PDEs) (Evgenov OV et al, 2006). A via NO-GCs-GMPc é utilizada como alvo do tratamento de doenças cardíacas. Atualmente diversas moléculas são utilizadas como agonistas de GCs independente de óxido nítrico (do inglês *nitric oxide* NO) (Derbyshire ER e Marletta MA, 2012). Um desses ativadores é o BAY 41-2272 (5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine) que é derivado da pirazolopiridina e atua como um ativador de GCs heme dependente e independente de óxido nítrico (NO) (Boerrigter G et al., 2007). É um composto que se liga a GCs em uma região da subunidade α_1 que contém as Cys238 e Cys243 e modula a atividade catalítica e a responsividade do ligante ao grupo heme (Stasch JP et al, 2001).

Figura 1 Via de sinalização NO/GMPc

O complexo Ca^{2+} /calmodulina(CaM) liga-se a óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*). NOS catalisa a oxidação da L-arginina (L-Arg_ em L-citrulina (L-Cit) e óxido nítrico (NO). NO liga-se ao grupamento ferro-heme da GCs. Esta ligação leva ao aumento nos níveis de GMPc. O GMPc liga-se e ativa proteína quinase dependente de GMPc (cGKs), fosfodiesterases (PDEs) e canais de íons. Fonte: Derbyshire ER e Marletta MA,2012.

Estudos indicam que o BAY 41-2272 induz, *in vitro*, relaxamento arterial em ovelhas e ratos, enquanto *in vivo*, atenua a hipertensão pulmonar em cordeiros, diminui pressão sanguínea e tem atividade anti-plaquetária em ratos e também induz a descompressão do coração em um modelo canino de insuficiência cardíaca congestiva. Além disso, este fármaco leva ao relaxamento do corpo cavernoso em humanos e coelhos, de uretra em coelhos, do músculo detrusor em coelhos, ratos e camundongos, e do músculo liso traqueal de ratos. (Cosyns SMR e Lefebvre RA 2012)

Figura 2 Estrutura do BAY 41-2272

Estrutura do BAY 41-2272 (A). Sítios de ligação do BAY 41-2272 (B) e do NO (C) à enzima Guanilato Ciclase solúvel.

No contexto da resposta imunológica o cGMP participa de vários processos, como diferenciação, quimiotaxia e proliferação celular, além da liberação de mediadores solúveis (Ciuman M et al, 2006). Recentemente, demonstramos que células THP-1 e monócitos do sangue periférico se ativam quando tratados com BAY 41-2272 aumentando: liberação de anião superóxido (O_2^-); expressão dos genes *CYBB* e *NCF2*; nível intracelular de GMPc e AMPc; respostas fagocíticas e microbidas; liberação de TNF- α e IL-12p70 (Oliveira-Junior et al, 2007; Soeiro-Pereira et al, 2010). Neste contexto, o BAY 41-2272, e a via por ele induzida, é um potencial imunomodulador.

1.6 Guanilato ciclase solúvel e Linfócitos

Os estudos sobre a via da GCs atribuem ao NO um papel importante na regulação dos sistemas cardiovascular, gastrointestinal, respiratório, nervoso e imune. Além disso, nas células do sistema imune vêm revelando novas funções e modos de ação desta via no controle e escape de patógenos, na diferenciação de linfócitos e na defesa contra tumores (Bogdan C, 2015). Já foi demonstrado que NO inibe a adesão de eosinófilos humanos a matriz extracelular *in vitro* (Conran N, et al, 2001; Thomazzi SM et al, 2005). Além disso sabemos que em neutrófilos e células mononucleares humanas o NO e o BAY 41-2272 podem estimular ou inibir a quimiotaxia e adesão *in vitro* (Thomazzi SM, et al 2004). Também foi demonstrado que o

BAY 41-2272 atua de forma eficaz na modulação de células do sistema imunológico, levando ao controle de infecções (Oliveira-Junior et al, 2007; Soeiro-Pereira et al, 2010).

A ação da via NO-GCs-GMPc nos linfócitos T vem sendo muito estudada. O NO exógeno inibe a proliferação ou até mesmo leva as células T à morte. Por outro lado, foi observado que pequenas quantidades de NO leva à sobrevivência e diferenciação das subpopulações de células T (Bogdan C, 2015).

Já foi demonstrado que a ativação da GC por baixos níveis de NO, elevando os níveis de GMPc, induz seletivamente a expressão do receptor de IL-12 beta2 (IL-12R β 2) e não de IL-4R nas células T (Niedbala, 2002). Também foi demonstrado que o aumento da concentração intracelular de GMPc induz o influxo de cálcio e a produção de IL-4 (Gomes, 2006). Além disso, foi observado que o NO induz uma população de células T regulatórias, com um perfil de marcadores característico (CD25⁺, CD27⁺, FOXP3⁻, GITR⁺, T-bet^{low}, GATA3^{high}), mas similares à células T reguladoras naturais (Bogdan C, 2011). Assim, o BAY 41-2272, e a via por ele induzida, possui um potencial para imunomodular os linfócitos T.

Tendo em vista que o BAY 41-2272 tem se mostrado eficaz na ativação de células fagocíticas e mononucleares, e levando em consideração o potencial da via da Guanilato Ciclase solúvel para a resposta de células T, nossa hipótese é que o tratamento *in vitro* com este fármaco terá um efeito imunomodulador sobre estas células. A comprovação do potencial desse fármaco, potencialmente trará em médio / longo prazo, benefícios diretos para os pacientes com imunodeficiências primárias, podendo ser usado diretamente, ou levar ao desenvolvimento de novas drogas imunomoduladoras para o tratamento das IDPs e outras imunopatologias.

2.1 Objetivo Geral

Tendo em vista que o BAY 41-2272 foi eficaz na ativação de células fagocíticas e mononucleares, e levando em consideração o potencial da via da Guanilato Ciclase solúvel para a resposta de células T, nossa hipótese é que o tratamento *in vitro* com este fármaco terá um efeito imunomodulador sobre estas células. Dessa forma, temos como objetivo estudar o efeito do BAY 41-2272 sobre os linfócitos T e definir seus mecanismos de ação.

3.1 Algoritmo de experimentação

O algoritmo abaixo traz os procedimentos realizados neste projeto para melhor entendimento.

Figura 3 Sequência de experimentos realizados com o material humano.

3.2 Obtenção de Linfócitos do Sangue Periférico

Os linfócitos foram obtidos de um volume de 20 mL de sangue periférico coletados de indivíduos sadios (sem doenças infecto-contagiosas ou congênicas diagnosticadas). As alíquotas de sangue foram então fracionadas em gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque (densidade = 1,077 g/ml; GE Healthcare, Suécia). Em seguida as células mononucleares (PBMC) já separadas foram cultivadas em placas de 6 poços de fundo chato, em meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de

estreptomicina) a 37°C, em atmosfera úmida, saturada em 5% de CO₂, em condições livre de endotoxina (<10pg/mL) por 2 horas para isolar a população de Linfócitos dos Monócitos. Os Linfócitos, que não são aderentes, foram coletados e tratados com os fármacos utilizados no presente trabalho.

3.3 Tratamentos Farmacológicos

Para definição das doses aplicadas a serem aplicadas no nosso estudo, tomamos como base o trabalho de Soeiro-Pereira e colaboradores (2010). Os tratamentos utilizados e suas respectivas concentrações encontram-se na **Tabela 1** abaixo. A partir destas células, após tratamento, realizaremos os experimentos.

Tabela 1 Tratamentos utilizados para os ensaios

Tratamento	Concentrações	Tempo	Descrição
BAY 41-2271	0,1µM, 0,3µM, 1µM, 3 µM, 10 µM e 30 µM	3 hr, 24 hrs e 48 hrs	ativador de GCs testado nesse estudo
PMA	30nM e 90nM	3 hr, 24 hrs e 48 hrs	do inglês, acetato de miristato de forbol, ativador de proteína quinase C
Ionomicina	500ng/mL	24 hrs e 48 hrs	ionóforo de Ca ²⁺
IL-12rh	1ng/mL	24 hrs e 48 hrs	Citocina ativadora de Linfócitos T
8-Br-GMPc	100µM	24 hrs e 48 hrs	análogo do GMP cíclico, como controle positivo específico da via da GCs

8-Br-AMPC	100µM	24 hrs e 48 hrs	análogo do AMP cíclico
ODQ	100µM	30 min	Inibidor da GCs
W45	1 µM	30 min	Inibidor da PKG
SNAP	1 µM	24 hrs e 48hrs	Doador de óxido nítrico, ativa GCs

3.4 Viabilidade por Live/Dead

As células foram tratadas com 0,1µM à 30 µM de BAY 41-2272, 30nM e 90nM de PMA e 0,005% à 1% de DMSO durante 24 ou 48 horas. Após os estímulos, conferimos a viabilidade das células utilizando o kit LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain (L34955, Life Technologies). Foi coletado 2×10^5 células pré e pós-tratamento, e ressuspensas em 100µL de PBS (1X), adicionando 1µL de LIVE/DEAD. Incubar em 4°C por 30 minutos protegido da luz. Após a marcação com LIVE/DEAD as amostras foram lavadas com PBS (1X), o sobrenadante descartado e ressuspensas em PBS adicionado de 1% de paraformaldeído. Foi analisado por citometria de fluxo, usando filtro violeta com excitação em 405nm.

3.5 Avaliação da Ativação Celular

3.5.1 Produção de citocinas

A avaliação da produção das citocinas foi realizada após o tratamento das células não aderentes. Estas, foram separadas em dois grupos: 1) Sem pré-tratamento e 2) Tratadas com 0,1µM à 30 µM de BAY 41-2272 e 100 µM de 8-Br-cGMP por 24 horas. As células do grupo 1 foram tratadas com 0,1µM

à 30 μ M de BAY 41-2272, 8-Br-cGMP, 30 nM ou 90nM de PMA adicionado de 500ng/mL de Ionomicina e 10ng/mL de IL-12rh (controle positivo para polarização Th1) durante 24 ou 48 horas. Já as células do grupo 2 foram divididas em dois subgrupos e tratadas ou não com 100 μ M de ODQ por 30 min, posteriormente, foram tratadas com 0,1 μ M à 30 μ M de BAY 41-2272 e 100 μ M de 8-Br-cGMP por 24 horas (**Figura 4**). Após 24 horas as células que tiveram o pré-tratamento foram estimuladas com 30 nM ou 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina durante 24 horas.

Foram utilizados 100 μ L de anticorpos monoclonais específicos para captura das citocinas humanas (IL-4, IL-10, IFN- γ) adicionados à placas de ELISA de 96 poços, em concentrações específicas para cada citocina e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com PBS/Tween 0,05% 3 vezes e bloqueadas por duas horas com 200 μ L uma solução a 1% de BSA e 5% de sacarose em PBS. Após este período as placas foram lavadas novamente, e 50 μ L de amostras ou da curva padrão de citocinas, em duplicata, foram colocados para incubação por mais 2 horas em temperatura ambiente. Após nova lavagem foram adicionados 100 μ L de um segundo anticorpo policlonal biotinilado que se liga às citocinas, e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e incubadas com peroxidase (*Horseradish Peroxidase* BD Biosciences) conjugada à avidina (Genzyme Diagnostics) 1,25 ng/mL diluída em 1% BSA/PBS, durante 20 minutos a 37°C. Após 3 lavagens com PBS, foram adicionados 100 μ L de reagente tetrametilbenzidina (TMB®- Sigma) para revelar a reação. Após cerca de 30 minutos a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 30% e a absorbância lida em um comprimento de onda de 450 nm no leitor de ELISA.

A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão feita com as respectivas citocinas humanas recombinantes, utilizadas em uma diluição seriada a partir de 2.000 até 15,62 pg/mL. Os resultados da absorbância foram analisados por regressão linear no programa GraphPad Prism Software Versão 4.0. As concentrações de citocinas das amostras foram dadas em pg/mL.

Figura 4 Esquema representativo dos tratamentos utilizados para avaliar a produção de citocinas

3.5.2 Expressão de CD69

As células foram separadas em dois grupos: 1) Sem pré-tratamento e 2) Tratadas com 3 μ M, 30 μ M de BAY 41-2272 e 100 μ M de 8-Br-cGMP por 24 horas. As células do grupo 1 foram tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272, 100 μ M 8-Br-cGMP, 100 μ M 8-BR-cAMP, 1 μ M SNAP e 90nM de PMA adicionado de 500ng/mL de Ionomicina durante 3 horas. Já as células do grupo 2 foram divididas em dois subgrupos e tratadas ou não com 100 μ M de ODQ ou 1 μ M de W45 por 30 min, posteriormente, foram tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272 e 100 μ M de 8-Br-cGMP por 24 horas. Após 24 horas as células que tiveram o pré-tratamento foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina durante 3 horas (**Figura 5**). Após os estímulos, avaliamos a expressão de CD69. Foi coletado 2×10^5 células pré e pós-tratamento, e ressuspensas em 100 μ L de PBS (1X),

adicionando os anticorpos anti-CD3, Anti-CD4, Anti-CD8 e Anti-CD69. Foram incubadas a 4°C por 30 minutos protegido da luz. Após a marcação com os anticorpos as amostras foram lavadas com PBS (1X), o sobrenadante descartado e ressuspendidas em PBS adicionado de 1% de paraformaldeído. Foi analisado por citometria de fluxo.

Figura 5 Esquema representativo dos tratamentos utilizados para avaliar a expressão de CD69

3.6. Expressão de CD25

As células foram separadas em dois grupos: 1) Sem pré-tratamento e 2) Tratadas com 3 μ M, 30 μ M de BAY 41-2272 e 100 μ M de 8-Br-cGMP por 24 horas. As células do grupo 1 foram tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272, 8-Br-cGMP e 90nM de PMA adicionado de 500ng/mL de Ionomicina durante 24 horas. Já as células do grupo 2 foram divididas em dois subgrupos e tratadas ou não com 100 μ M de ODQ por 30 min, posteriormente, foram tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272 e 100

μM de 8-Br-cGMP por 24 horas. Após 24 horas as células que tiveram o pré-tratamento foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina durante 24 horas (**Figura 6**). Após os estímulos, avaliamos a expressão de CD25. Foi coletado 2×10^5 células pré e pós-tratamento, e ressuspensas em 100 μL de PBS (1X), adicionando os anticorpos anti-CD3, Anti-CD4 e Anti-CD25. Foram incubadas a 4°C por 30 minutos protegido da luz. Após a marcação com os anticorpos as amostras foram lavadas com PBS (1X), o sobrenadante descartado e ressuspensas em PBS adicionado de 1% de paraformaldeído. Foi analisado por citometria de fluxo.

Figura 6 Esquema representativo dos tratamentos utilizados para avaliar a expressão de CD25

3.7 Expressão de FOXP3, ROR γ T, T-bet e GATA3

As células foram separadas em dois grupos: 1) Sem pré-tratamento e 2) Tratadas com 3 μM , 30 μM de BAY 41-2272 e 100 μM de 8-Br-cGMP, 100 μM de 8-Br-cAMP, 1 μM SNAP por 24 horas. As células do grupo 1 foram

tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272, 8-Br-cGMP e 90nM de PMA adicionado de 500ng/mL de Ionomicina durante 24 horas. Já as células do grupo 2 foram divididas em dois subgrupos e tratadas ou não com 100 μ M de ODQ ou 1 μ M de W45 por 30 min, posteriormente, foram tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272 e 100 μ M de 8-Br-cGMP por 24 horas. Após 24 horas as células que tiveram o pré-tratamento foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina durante 24 horas (**Figura 7**). Após os estímulos, foi coletado 2×10^5 células pré e pós-tratamento, e ressuspendidas em 100 μ L de PBS (1X), adicionando os anticorpos Anti-CD3 e Anti-CD8 por 4°C por 30 min. As amostras foram lavadas com PBS (1X), o sobrenadante descartado e fixadas e permeabilizadas segundo protocolo do Kit Transcription Factor Buffer (BD Bioscience). As amostras foram incubadas com os anticorpos Anti-FOXP3, Anti-ROR γ T, Anti-T-bet ou Anti-GATA3 à 4°C por 1 hora protegido da luz. Após a marcação com os anticorpos as amostras foram lavadas com PBS (1X), o sobrenadante descartado e ressuspendidas em PBS adicionado de 1% de paraformaldeído. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

Figura 7 Esquema representativo dos tratamentos utilizados para avaliar a expressão de FOXP3, ROR γ T, T-bet e GATA3

3.8 Dosagem de GMPc

As células foram tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272, SNAP e 90nM de PMA adicionado de 500ng/mL de Ionomicina durante 10 min. Após os estímulos, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. As células foram tratadas de acordo com o protocolo do kit Cyclic GMP EIA Kit (Cayman Chemical, No 581021, Ann Arbor, Michigan). 2×10^5 células pré e pós-tratamento foram lisadas com 100 μ L de HCl à 0,1M por 20 min à temperatura ambiente. As células lisadas foram centrifugadas e 50 μ L do sobrenadante das amostras foram utilizadas para a realização do protocolo. 50 μ L das amostras ou do cGMP EIA standard, em duplicata, foram colocados em conjunto com o 50 μ L do cGMP EIA Antiserum e 50 μ L do cGMP AChE Tracer e incubados *overnight* a 4°C. Após este período as placas foram lavadas 6 vezes com o EIA Buffer e então foram adicionados 200 μ L do "Ellman's reagente" em todos os poços. A placa foi incubada por

um período de 90 min à TA sob agitação protegida da luz. Após esse período a absorbância foi lida em um comprimento de onda de 412 nm no leitor de ELISA.

A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão, utilizada em uma diluição seriada a partir de 30 até 0,23 pmol/mL. Os resultados da absorbância foram analisados por regressão linear. As concentrações de GMPc das amostras foram dadas em pmol/mL.

3.9 Linfoproliferação

As células foram tratadas com 5mM de CFSE (Invitrogen, Oregon, USA) segundo protocolo do fabricante. Após a marcação as células do grupo 1 foram tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272 100 μ M 8-Br-cGMP, 100 μ M 8-Br-cAMP, SNAP e 1% de fitohemaglutinina durante 5 dias. As células as células do grupo 2 foram tratadas com 3 μ M, 30 μ M de BAY 41-2272, 100 μ M de 8-Br-cGMP, 100 μ M de 8-Br-cAMP ou 1 μ M SNAP por 24 horas e após o pré-tratamento foram estimuladas com 1% de fitohemaglutinina por 5 dias. Posteriormente as amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

3.10 Imunofenotipagem

Após a obtenção do linfócitos, as células foram marcadas com Anti-CD3, Anti-CD4, Anti-CD8, Anti-CD45RA, Anti-CD27 durante 30 min à 4°C. Após a marcação com os anticorpos as amostras foram lavadas com PBS (1X), o sobrenadante descartado e ressuspensas em PBS. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

3.11 Análise estatística

Após análise da distribuição dos dados por teste de normalidade como o teste de Kolmogorov-Smirnov, verificamos a avaliação estatística a ser utilizada. Devido a distribuição amostral utilizamos o teste ONE-way Anova

seguido do teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, a probabilidade de $p < 0,05$ capaz de revelar a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os dados dos diferentes grupos (da Silva, 2003). Todas as análises foram realizadas no Software Prism 4.00 (GraphPad Softawer Inc.).

4. RESULTADOS

No presente trabalho nosso objetivo foi avaliar o potencial do BAY 41-2272, agonista da guanilato ciclase solúvel, e sua via, como uma ferramenta para a modulação da função dos linfócitos. Nesse contexto, como forma de evidenciar o papel do BAY 41-2272 na ativação dos linfócitos, analisamos a produção de citocinas, um indicador do tipo e grau da resposta induzida por estímulos específicos.

O BAY 41-2272 não apresenta solubilidade em água, sendo dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido). Uma vez que esta substância apresenta uma série de ações farmacológicas, inicialmente analisamos se o DMSO interfere na produção ou liberação de IFN- γ . Os resultados mostraram que o tratamento com DMSO, por 24 ou 48 horas, não interfere na liberação de IFN- γ por linfócitos do sangue quando comparado ao controle não estimulado (**Figura 8**). Além da produção de citocinas, avaliamos a viabilidade celular, para saber se o DMSO altera a viabilidade dos linfócitos. As concentrações de DMSO usadas na diluição do BAY 41-2272 (de 0,005% à 0,01%) e as doses de BAY 41-2272 utilizadas no presente trabalho não interferiram na viabilidade celular (**Figura 9**). Dessa forma, seguimos com os experimentos de dosagem de citocinas.

Figura 8 Liberação de Interferon γ por Linfócitos após estímulo com DMSO

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina e doses crescentes de DMSO (0,1%; 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%; 3,5%) durante 24 e 48 horas, A e B, respectivamente. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de Interferon- γ . NE - não estimulado. N=3, mediana e máximo, *** $p < 0,001$, teste One-way Anova seguido do teste de Tukey.

Figura 9 Ensaio de Viabilidade Celular

Mediana da intensidade da fluorescência da população de linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 90nM de PMA, doses crescentes de DMSO (0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1%) e de BAY 41-2271 (0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M) durante 24 e 48 horas, A e B, respectivamente. Após tratamento, as células foram incubadas durante 30 min à 4°C com LIVE/DEAD Violet Dead Cell Stain. Posteriormente, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo, usando filtro com excitação e 405nm, n=4, mediana e máximo, *** p<0,001, teste One-way Anova seguido do teste de Tukey.

Inicialmente, avaliamos a produção de IFN- γ após o tratamento com BAY 41-2272, por 24 ou 48 horas. Observamos que este fármaco não induziu a produção de IFN- γ por linfócitos (**Figuras 10 e 11**).

Figura 10 Liberação de Interferon- γ por linfócitos por 24 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina e doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M) durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de Interferon- γ . N=6, mediana e máximo, *** $p < 0,001$ em relação ao controle NE, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Figura 11 Liberação de Interferon- γ por linfócitos por 48 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina e doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M) durante 48 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de Interferon- γ . N=3, mediana e máximo, *** $p < 0,001$ em relação ao controle NE, teste One-way Anova seguido do teste de Tukey.

Além da produção de Interferon- γ , nós analisamos a produção de IL-4, após tratamento com BAY 41-2272, por 24 ou 48 horas. O tratamento com BAY 41-2272 não induziu de forma significativa a produção de IL-4. (**Figuras 12 e 13**).

Figura 12 Liberação de IL-4 por linfócitos por 24 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina e doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 µM; 0,3 µM; 1 µM; 3 µM; 10 µM; 30 µM) durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de IL-4. N=6, mediana e máximo, *** p<0,001 em relação ao controle NE, teste One-way Anova seguido do teste de Tukey.

Figura 13 Liberação de IL-4 por linfócitos por 48 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de Iononomicina e doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 µM; 0,3 µM; 1 µM; 3 µM; 10 µM; 30 µM) durante 48 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de IL-4. N=3, mediana e máximo, *** $p < 0,001$ em relação ao controle NE, teste One-way Anova seguido do teste de Tukey.

Analizamos, também, a produção de IL-10 após tratamento com BAY 41-2272, por 24 ou 48 horas. Não foi observada alteração na produção de IL-10 pelos linfócitos (**Figuras 14 e 15**).

Figura 14 Liberação de IL-10 por linfócitos por 24 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina e doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 µM; 0,3 µM; 1 µM; 3 µM; 10 µM; 30 µM) durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de IL-10. N=6, mediana e máximo, *** $p < 0,001$ em relação ao controle NE, teste One-way Anova seguido do teste de Tukey.

Figura 15 Liberação de IL-10 por linfócitos por 48 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina e doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 µM; 0,3 µM; 1 µM; 3 µM; 10 µM; 30 µM) durante 48 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de IL-10. N=3, mediana e máximo, *** $p < 0,001$ em relação ao controle NE, teste One-way Anova seguido do teste de Tukey.

Uma vez que o tratamento com o BAY 41-2272, como forma direta de ativação, não induziu a produção de IFN- γ , IL-4 ou IL-10, avaliamos se o fármaco apresentaria potencial como *priming* para estas células. Para tanto, realizamos um pré-tratamento por 24 horas com diferentes doses do BAY 41-2272 e posterior ativação com PMA e Ionomicina ou IL-12, analisando na sequência o mesmo conjunto de citocinas. Observamos que o pré-tratamento com BAY 41-2272 não alterou o perfil de produção de IFN- γ pelos linfócitos, por 24 e 48 horas, quando comparado com a produção de IFN- γ pelos linfócitos que não tiveram o pré-tratamento com este fármaco. Em relação a IL-12, não observamos liberação de IFN- γ após estímulo com esta citocina, sendo necessários a realização de outros ensaios (**Figuras 16, 17**). Diferentemente, o pré-tratamento com BAY 41-2272, inibiu a produção de IL-4 e IL-10 (**Figuras 18, 19, 20 e 21**).

Figura 16 Liberação de IFN- γ por linfócitos, por 24 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272

Os linfócitos de sangue periférico foram pré-estimulados com doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M) durante 24 horas. Após estas 24 horas os linfócitos foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de ionomicina durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de Interferon- γ . N=6, mediana e máximo, * p <0,05, ** p <0,01, *** p >0,001 teste Anova seguido do teste de Tukey em relação ao controle NE 48 hrs; ### p <0,01, #### p <0,001 para ANOVA seguido do teste de Tukey em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA e Ionomicina.

Figura 17 Liberação de IFN- γ por linfócitos, por 48 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272

Os linfócitos de sangue periférico foram pré-estimulados com doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M) durante 24 horas. Após estas 24 horas os linfócitos foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de ionomicina durante 48 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de Interferon- γ . N=3, mediana e máximo, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 teste Anova seguido do teste de Tukey em relação ao controle NE 48 hrs; # p <0,05, ## p <0,01, ### p <0,001 para ANOVA seguido do teste de Tukey em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA e Ionomicina.

Figura 18 Liberação de IL-4 por linfócitos, por 24 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272

Os linfócitos de sangue periférico foram pré-estimulados com doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μM; 0,3 μM; 1 μM; 3 μM; 10 μM; 30 μM) durante 24 horas. Após estas 24 horas os linfócitos foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de ionomicina durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de IL-4. N=6, mediana e máximo, **p<0,01, *** p<0,001 teste Anova seguido do teste de Tukey em relação ao controle NE 48 hrs; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 para ANOVA seguido do teste de Tukey em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA e Ionomicina.

Figura 19 Liberação de IL-4 por linfócitos, por 48 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272

Os linfócitos de sangue periférico foram pré-estimulados com doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μM; 0,3 μM; 1 μM; 3 μM; 10 μM; 30 μM) durante 24 horas . Após estas 24 horas os linfócitos foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de ionomicina durante 48 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem e IL-4. N=3, mediana e máximo, *p<0,05 para Anova seguido do teste de Tukey em relação ao controle NE 48 hrs; #p<0,05 para ANOVA seguido do teste de Tukey em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA e Ionomicina.

Figura 20 Liberação de IL-10 por linfócitos, por 24 horas, após pré-tratamento com BAY 41-2272

Os linfócitos de sangue periférico foram pré-estimulados com doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μM; 0,3 μM; 1 μM; 3 μM; 10 μM; 30 μM) durante 24 horas. Após estas 24 horas os linfócitos foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de ionomicina durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de IL-10. N=6, mediana e máximo, *p<0,05, *** p<0,001 teste Anova seguido do teste de Tukey em relação ao controle NE 48 hrs; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 para ANOVA seguido do teste de Tukey em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA e Ionomicina.

Figura 21 Liberação de IL-10 por linfócitos por 48 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram pré-estimulados com doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μM; 0,3 μM; 1 μM; 3 μM; 10 μM; 30 μM) durante 24 horas. Após estas 24 horas os linfócitos foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de ionomicina durante 48 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de IL-10. N=3, mediana e máximo, *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001 teste Anova seguido do teste de Tukey em relação ao controle NE 48 hrs; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 para ANOVA seguido do teste de Tukey em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA e Ionomicina.

Analisando os resultados encontrados, observamos que o tratamento com PMA adicionado de Ionomicina poderia estar mascarando um eventual efeito do BAY 41-2272 nestas células. Neste caso, os estímulos poderiam gerar uma super ativação e, assim, interferir no efeito do fármaco nos linfócitos. Nesse contexto, avaliamos o efeito do pré-tratamento com este fármaco e posterior ativação com 90nM e 30 nM de PMA sem a adição de Ionomicina. Observamos que o BAY 41-2272 não induziu produção de IFN- γ , como já observado nos resultados anteriores, e vimos, também, que as doses de 90nM e 30nM de PMA induzem produção de IFN- γ de forma significativa quando comparado com o controle não estimulado (**Figura 22**).

Figura 22 Liberação de Interferon- γ por Linfócitos por 24 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 30nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina e doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M) durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de Interferon- γ . N=3, mediana e máximo, * $p < 0,05$ em relação ao controle NE, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Foi avaliado, também, o pré-tratamento com as diferentes doses de BAY 41-2272 com posterior ativação com 90nM e 30 nM de PMA. Além dos tratamentos já descritos, nós adicionamos o ODQ, que inibe a via da guanilato ciclase solúvel de forma irreversível. Foi observado que o pré-tratamento com o BAY 41-2272 inibiu de forma significativa a ativação e liberação de IFN γ pelos linfócitos, por 24 horas, comparado ao controle pós-ativado com 90nM de PMA. Já o tratamento com o ODQ, não interferiu na produção de IFN γ (**Figura 23 e 24**).

Figura 23 Liberação de Interferon γ por linfócitos após pré-tratamento com BAY 41-2272 com posterior ativação com 90nM de PMA

Os linfócitos de sangue periférico foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratado com 100 μ M de ODQ durante 30 min. Após os dois grupos foram incubados com doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M) durante 24 horas. Após estas 24 horas os linfócitos foram estimulados com 90nM de PMA durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de Interferon- γ . N=3, mediana e máximo, * p <0,05, ** p <0,01, *** p >0,001 teste Anova seguido do teste de Tukey em relação ao controle NE 48 hrs; # p <0,05, ## p <0,01, ### p <0,001 para ANOVA seguido do teste de Tukey em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA.

Figura 24 Liberação de Interferon γ por linfócitos após pré-tratamento com BAY 41-2272 com posterior ativação com 30nM de PMA

Os linfócitos de sangue periférico foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratado com 100 μ M de ODQ durante 30 min. Após, os dois grupos foram incubados com doses crescentes de BAY 41-2271 (0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M) durante 24 horas. Após estas 24 horas os linfócitos foram estimulados com 30nM de PMA durante 24 horas. Após tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado para a realização da dosagem de Interferon- γ . N=3, mediana e máximo, * p <0,05, *** p <0,001 teste Anova seguido do teste de Tukey em relação ao controle NE 48 hrs; # p <0,05, ### p <0,001 para ANOVA seguido do teste de Tukey em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA.

Figura 25 Expressão de CD69

Representação gráfica das populações analisadas nos ensaios de expressão de CD69. (A) Tamanho e Complexidade; (B) Seleção da população que expressa CD3; (C) População que expressa CD3 e CD4; (D) População que expressa CD3 e CD8; (E e F) Seleção das populações que expressam CD69, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, respectivamente. Dotplot e histogramas representativos referente à amostra não estimulada.

Tendo em vista que os resultados até agora encontrados demonstraram um perfil inibitório do BAY 41-2272 nos linfócitos, avaliamos a capacidade deste fármaco de ativar estas células através da expressão de CD69, um marcador de ativação clássico, expresso nos estágios iniciais da ativação. Baseado nos ensaios de ELISA, selecionamos duas doses para dar prosseguimento ao estudo, 3 μ M e 30 μ M. Após isso, as células foram tratadas e avaliadas quanto à expressão de CD69. Inicialmente foi realizada a seleção das populações de interesse, linfócitos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ (**Figura 24**). O tratamento com BAY 41-2272 não induziu à expressão de CD69 nas populações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ ou T CD3⁺CD8⁺, quando comparadas ao controle não estimulado (**Figura 26**).

Figura 26 Expressão de CD69 em linfócitos T CD3⁺

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 90nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina, BAY 41-2271 (3 μ M e 30 μ M) e 100 μ M 8-Br-cGMP durante 3 horas. Após tratamento, as amostras foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD69 para a leitura no citômetro de fluxo. (A) População CD3⁺CD4⁺CD69⁺; (B) População CD3⁺CD8⁺CD69⁺. N=6, mediana e máximo, ***p<0,001 em relação ao controle NE, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

O papel inibitório do BAY 41-2272 foi observado quando as células receberam o pré-tratamento de 24 horas antes de serem estimuladas com PMA. Dessa forma analisamos o efeito na expressão de CD69 do pré-

tratamento deste fármaco com posterior estimulação com PMA e Ionomicina. Não observamos o efeito inibitório na expressão de CD69 na população de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ que foi pré-tratada com 3 µM e 30 µM de BAY 41-2272 ou 8-Br-GMP e na população de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ que foi pré-tratada com 3 µM ou 8-Br-GMP (**Figura 27 e Figura 28A**). No entanto, na população de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ que foi pré-tratada com 30 µM de BAY 41-2272, teve uma diminuição significativamente estatística da expressão de CD69 após estímulo com PMA e Ionomicina, quando comparado ao controle estimulado com PMA e Ionomicina sem pré-tratamento (**Figura 28B**). Além disso, o tratamento com os inibidores da via da guanilato ciclase solúvel (GCs), ODQ e W45, não recuperam a expressão de CD69, sugerindo que BAY 41-2272 na dose de 30 µM tem um papel inibitório independente da GCs.

Figura 27 Expressão de CD69 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas na população de linfócitos T CD3⁺CD8⁺

População de linfócitos T CD3⁺CD8⁺CD69⁺. Os linfócitos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratados com 100 μM de ODQ e 1 μM W45 durante 30 min. Após, os grupos foram incubados com 3 μM (A) e 30 μM (B) BAY 41-2271 ou 100 μM de 8Br-GMP durante 24 horas. Após tratamento de 24 horas, as amostras foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina por 3 horas. Após 3 horas, as células foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD69 para a leitura no citômetro de fluxo. N=6, mediana e máximo, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle não tratado estimulado com PMA/Ionomicina, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Figura 28 Expressão de CD69 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas na população de linfócitos T CD3⁺CD4⁺

População de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD69⁺. Os linfócitos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratados com 100 µM de ODQ e 1 µM W45 durante 30 min. Após, os grupos foram incubados com 3 µM (A) e 30 µM (B) BAY 41-2271 ou 100 µM de 8Br-GMP durante 24 horas. Após tratamento de 24 horas, as amostras foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina por 3 horas. Após 3 horas, as células foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD69 para a leitura no citômetro de fluxo. N=6, mediana e máximo, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle não tratado estimulado com PMA/Ionomicina, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Em paralelo, avaliamos a expressão de dois fatores de transcrição, FOXP3 e ROR γ T, após o tratamento com o BAY 41-2272. Inicialmente foi realizado a seleção das populações de interesse, linfócitos T CD3⁺CD8⁺ e linfócitos T CD4 foram considerados os linfócitos T CD3⁺CD8⁻ (**Figura 29**). O tratamento com BAY 41-2272 não induziu à expressão de FOXP3 e ROR γ T nas populações de linfócitos T CD8 ou T CD4, quando comparadas ao controle não estimulado (**Figura 30 e 31**).

Figura 29 Expressão de FOXP3 e ROR γ T

Representação gráfica das populações analisadas nos ensaios de expressão de FOXP3 e ROR γ T. (A) Tamanho e Complexidade; (B) Seleção da população que expressa CD3; (C) População CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD8⁻ (Linfócitos T CD4); (D e E) Expressão de ROR γ T e FOXP3, respectivamente, da população de linfócitos T CD3⁺CD8⁻; o mesmo realizado na população de linfócitos T CD3⁺CD8⁺, gráficos não apresentados. Dotplot e histogramas representativos referente à amostra não estimulada.

Figura 30 Expressão de FOXP3 em linfócitos T CD3⁺

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 90nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina, BAY 41-2271 (3 μ M e 30 μ M) e 100 μ M 8-Br-cGMP durante 24 horas. Após tratamento, as amostras foram marcadas com anti-CD3 e anti-CD8. Após a marcação extracelular as amostras foram fixadas e permeabilizadas e posteriormente marcadas com anti-FOXP3 para a leitura no citômetro de fluxo. (A) Linfócitos T CD4 (CD3⁺CD8⁻); (B) Linfócitos T CD8 (CD3⁺CD8⁺). N=4, mediana e máximo, *p<0,05 em relação ao controle NE, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Figura 31 Expressão de ROR γ T em linfócitos T CD3⁺

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 90nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina, BAY 41-2271 (3 μ M e 30 μ M) e 100 μ M 8-Br-cGMP durante 24 horas. Após tratamento, as amostras foram marcadas com anti-CD3 e anti-CD8. Após a marcação extracelular as amostras foram fixadas e permeabilizadas e posteriormente marcadas com anti-ROR γ T para a leitura no citômetro de fluxo. (A) Linfócitos T CD4 (CD3⁺CD8⁻); (B)

Linfócitos T CD8 ($CD3^+CD8^+$). N=4, mediana e máximo, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle NE, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Analizamos também o efeito do pré-tratamento deste fármaco com posterior estimulação com PMA e Ionomicina na expressão de FOXP3 e ROR γ T. Não observamos diferença estatística significativa expressão FOXP3 nas população de linfócitos T CD4 e T CD8 que foram pré-tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272 ou 8-Br-GMP quando comparado ao controle não tratado estimulado com PMA e Ionomicina (**Figura 32 e Figura 33**).

Figura 32 Expressão de FOXP3 em linfócitos T CD4 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas

População de linfócitos T CD4 (CD3⁺CD8⁻). Os linfócitos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratados com 100 μ M de ODQ e 1 μ M W45 durante 30 min. Após, os grupos foram incubados com (A) 3 μ M e (B) 30 μ M BAY 41-2271 ou 100 μ M de 8Br-GMP durante 24 horas. Após tratamento de 24 horas, as amostras foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina por 24 horas. Após 24 horas, as células foram marcadas com anti-CD3, anti-CD8. Após a marcação extracelular as amostras foram fixadas e permeabilizadas e posteriormente marcadas com anti-FOXP3 para a leitura no citômetro

de fluxo. N=4, mediana e máximo, *p<0,05 em relação ao controle não tratado estimulado com PMA/Ionomicina, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey

Figura 33 Expressão de FOXP3 em linfócitos T CD8 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas

População de linfócitos T CD⁺ (CD3⁺CD8⁺). Os linfócitos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratado com 100 µM de ODQ e 1 µM W45 durante 30 min. Após, os grupos foram incubados com (A) 3 µM e (B) 30 µM BAY 41-2271 ou 100 µM de 8Br-GMP durante 24 horas. Após tratamento de 24 horas, as amostras foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina por 24 horas. Após 24 horas, as células foram marcadas

com anti-CD3, anti-CD8. Após a marcação extracelular as amostras foram fixadas e permeabilizadas e posteriormente marcadas com anti-FOXP3 para a leitura no citômetro de fluxo. N=4, mediana e máximo, *p<0,05 em relação ao controle não tratado estimulado com PMA/Ionomicina, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey

A análise da expressão de ROR γ T não mostrou diferença estatística significativa nas populações de linfócitos T CD4 e T CD8 que foram pré-tratadas com 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272 ou 8-Br-GMP quando comparado ao controle não tratado estimulado com PMA e Ionomicina (**Figura 34 e Figura 35**).

Figura 34 Expressão de ROR γ T em linfócitos T CD4 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas

População de linfócitos T CD4 (CD3⁺CD8⁻). Os linfócitos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratado com 100 μ M de ODQ e 1 μ M W45 durante 30 min. Após, os grupos foram incubados com (A) 3 μ M e (B) 30 μ M BAY 41-2271 ou 100 μ M de 8Br-GMP durante 24 horas. Após tratamento de 24 horas, as amostras foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina por 24 horas. Após 24 horas, as células foram marcadas com anti-CD3, anti-CD8. Após a marcação extracelular as amostras foram fixadas e permeabilizadas e posteriormente marcadas com anti-ROR γ T para a leitura no citômetro de

fluxo. N=4, mediana e máximo, *p<0,05 em relação ao controle não tratado estimulado com PMA/Ionomicina, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey

Figura 35 Expressão de ROR γ T em linfócitos T CD8 após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas

População de linfócitos T CD8 (CD3⁺CD8⁺). Os linfócitos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratado com 100 μ M de ODQ e 1 μ M W45 durante 30 min. Após, os grupos foram incubados com (A) 3 μ M e (B) 30 μ M BAY 41-2271 ou 100 μ M de 8Br-GMP durante 24 horas. Após tratamento de 24 horas, as amostras foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina por 24 horas. Após 24 horas, as células foram marcadas

com anti-CD3, anti-CD8. Após a marcação extracelular as amostras foram fixadas e permeabilizadas e posteriormente marcadas com anti-ROR γ T para a leitura no citômetro de fluxo. N=4, mediana e máximo, *p<0,05 em relação ao controle não tratado estimulado com PMA/Ionomicina, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey

Os resultados encontrados sugerem um efeito inibitório do BAY 41-2272 nos linfócitos. Neste contexto, avaliamos a expressão do CD25, um dos marcadores presentes nas células T reguladoras. Observamos que o tratamento com este fármaco não induz a expressão de CD25 nos linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ (**Figura 36**). O pré-tratamento com 3 μ M de BAY 41-2272 com posterior ativação com PMA adicionado de Ionomicina não altera o perfil de expressão de CD25, no entanto o pré-tratamento com 30 μ M deste fármaco, inibe de forma significativa a expressão de CD25 quando comparado ao estimulado com PMA e Ionomicina sem pré-tratamento com Bay 41-2272 (**Figura 37**).

Figura 36 Expressão de CD25 em linfócitos T CD4⁺ tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 90nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina, 3 μ M e 30 μ M de BAY 41-2272 e 100 μ M de 8-Br-cGMP durante 24 horas. Após tratamento, as células foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD25 para

leitura no citômetro de fluxo. N=3, mediana e máximo, *p<0,05 em relação ao controle não estimulado, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey

Figura 37 Expressão de CD25 em linfócitos T CD4⁺ após pré-tratamento com BAY 41-2272 por 24 horas

População de linfócitos T CD4 (CD3⁺CD4⁺). Os linfócitos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi pré-tratado com 100 μ M de ODQ durante 30 min. Após, os grupos foram incubados com (A) 3 μ M e (B) 30 μ M BAY 41-2271 ou 100 μ M de 8Br-GMP durante 24 horas. Após tratamento de 24 horas, as amostras foram estimuladas com 90nM de PMA e

500ng/mL de Ionomicina por 24 horas. Após 24 horas, as células foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD25 para a leitura no citômetro de fluxo. N=3, mediana e máximo, * $p<0,05$ em relação ao controle não tratado estimulado com PMA/Ionomicina, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

O GMP cíclico (GMPc) é o produto da ativação da guanilato ciclase (GCs), assim, avaliamos a sua produção após estímulo com BAY 41-2272. O tratamento com BAY 41-2272 por 10 min induziu à produção de GMPc nos linfócitos, quando comparadas ao controle estimulado com SNAP, doador de do óxido nítrico e ativador da GCs (**Figura 38**).

Figura 38 Produção de GMPc em linfócitos após tratamento com BAY 41-2272

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 90nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina, BAY 41-2271 (3 µM e 30 µM) e 100 µM SNAP durante 10 min. Após tratamento, as células foram lisadas para a realização do ensaio de dosagem de GMPc. N=5 mediana e máximo, ** $p<0,01$ em relação ao controle não estimulado, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Além da expressão de FOXP3 e RORγT, avaliamos também a expressão de Tbet e GATA3, fatores de transcrição relacionados com as respostas Th1 e Th2, respectivamente. O estímulo com BAY 41-2272 não

induziu expressão de Tbet. Já após o pré-tratamento com 30 μ M de BAY 41-2272 por 24 horas mostrou uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de Tbet (**Figura 39**).

Figura 39 Expressão de Tbet em linfócitos T

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 90nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina, BAY 41-2271 (3 μ M e 30 μ M), 100 μ M 8-Br-cGMP, 100 μ M 8-Br-cAMP durante

24 horas. Após tratamento, as amostras foram marcadas com anti-CD3. Após a marcação extracelular as amostras foram fixadas e permeabilizadas e posteriormente marcadas com Tbet para a leitura no citômetro de fluxo. (N=3, mediana e máximo, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle tratado com PMA e Ionomicina, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Em relação à expressão de GATA3, não houve alterações estatísticas significativas quando observamos o grupo estimulado com BAY 41-2272 *per si*, como também o grupo que foi pré-tratado por 24 horas antes do estímulo com PMA e Ionomicina (**Figura 40**).

Figura 40 Expressão de GATA3 em linfócitos

Os linfócitos de sangue periférico foram estimulados com 90nM de PMA, 500 ng/mL de Ionomicina, BAY 41-2271 (3 µM e 30 µM), 100 µM 8-Br-cGMP, 100 µM 8-Br-cAMP durante 24 horas. Após tratamento, as amostras foram marcadas com anti-CD3. Após a marcação extracelular as amostras foram fixadas e permeabilizadas e posteriormente marcadas com GATA3 para a leitura no citômetro de fluxo. (N=3, mediana e máximo, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle NE, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Observamos que o BAY 41-2272 possui uma capacidade de alterar a expressão de marcadores extracelulares, bem como fatores de transcrição e produção de citocinas, assim, avaliamos o efeito deste fármaco na proliferação celular. O estímulo com este fármaco não é capaz de induzir linfoproliferação (**Figura 41 A**). O pré-tratamento com BAY 41-2272 foi capaz de diminuir significativamente a proliferação (**Figura 41 B**).

Figura 41 Ensaio de linfoproliferação

Os linfócitos de sangue periférico de grupo 1 (A) foram marcados com 5 µM de CFSE e foram estimulados com 1% de fitohemaglutinina (Fito), BAY 41-2271 (3 µM e 30 µM), 100 µM 8-Br-cGMP, 100 µM 8-Br-cAMP durante 5 dias. O segundo grupo (B) foi pré-tratado com BAY 41-2271 (3 µM e 30 µM), 100 µM 8-Br-cGMP, 100 µM 8-Br-cAMP, 1 µM SNAP ou 100 µM de ODQ por 24hrs. Após o pré-tratamento as amostras foram estimuladas com 1% de fitohemaglutinina por 5 dias. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. (N=5,

mediana e máximo, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle NE, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Para entender melhor os resultados também observamos o perfil fenotípico de memória da população de linfócitos que estudamos (**Tabela 2**). Observamos que as amostras estudadas encontram-se dentro dos valores de referência encontrados na população brasileira.

Tabela 2 Perfil fenotípico das amostras estudadas

	Media dos Controles	Valores de Referencia*
CD3 ⁺	59,8	65,2 (55,5-75,2)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,1	39,1(30,7-49)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺ CD27 ⁺	39,5	32,7(20,9-49,1)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁻ CD27 ⁺	39,2	33(20,8-45,6)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁻ CD27 ⁻	18,8	25,1(13,9-33,6)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺ CD27 ⁻	2,3	4,9 (2-10,3)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	33,9	21,5(13,8-27-4)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ CD27 ⁺	32,9	29(13,9-43,7)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁻ CD27 ⁺	20,1	3,4(1,5-7,4)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁻ CD27 ⁻	22	43,8(25-56,9)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ CD27 ⁻	25,8	23,3(9-44,7)

Linfócitos T (CD3⁺), Linfócitos T CD4 (CD3⁺ CD4⁺), Linfócitos T CD4 naiva (CD3⁺ CD4⁺ CD45⁺ CD27⁺), Linfócitos T CD4 de memória central (CD3⁺ CD4⁺ CD45⁻ CD27⁺), linfócitos T CD4 de memória efetora (CD3⁺ CD4⁺ CD45⁻ CD27⁻), Linfócitos T CD4 de diferenciação terminal(CD3⁺ CD4⁺ CD45⁺ CD27⁻). Linfócitos T CD8 (CD3⁺ CD8⁺), Linfócitos T CD8 naiva (CD3⁺ CD8⁺ CD45⁺ CD27⁺), Linfócitos T CD8 de memória central (CD3⁺ CD8⁺ CD45⁻ CD27⁺), linfócitos T CD8 de memória efetora (CD3⁺ CD8⁺ CD45⁻ CD27⁻), Linfócitos T CD8 de diferenciação terminal(CD3⁺ CD8⁺ CD45⁺ CD27⁻). *Valores de referência encontrados para a população brasileira de adultos saudáveis. N=10, média dos controles.

Para melhor entender a resposta dos linfócitos ao BAY 41-2272 e a via por ele induzida, avaliamos a expressão de CD69 com SNAP, que é um

ativador da guanilato ciclase solúvel, além dos estímulos de 8Br-cGMP e 8Br-cAMP. Como já observado não há indução da expressão de CD69 após estímulo com BAY 41-2272, SNAP, 8Br-cGMP e 8Br-cAMP (**Figura 42A**). Já o pré-tratamento com 30uM de BAY 41-2272 e 1 uM SNAP mostraram inibir a expressão de CD69 após estímulo com PMA/Ionomicina (**Figura 42B**).

Figura 42 Expressão de CD69

Os linfócitos de sangue periférico do grupo 1 foram marcados e estimulados com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina, BAY 41-2271 (3 μ M e 30 μ M), 100 μ M 8-Br-cGMP, 100 μ M 8-Br-cAMP, 1 μ M SNAP durante 3 hrs (A). O segundo grupo (B) foi pré-tratado com BAY 41-2271 (3 μ M e 30 μ M), 100 μ M 8-Br-cGMP, 100 μ M 8-Br-cAMP, 1 μ M SNAP ou 100 μ M de ODQ por 24hrs. Após o pré-tratamento as amostras foram estimuladas com 90nM de PMA e 500ng/mL de Ionomicina por 3 hrs. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. (N=9, mediana e máximo, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle NE, teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Sumarizando, realizamos tratamentos farmacológicos com BAY 41-2272 e observamos que este fármaco como ativador direto, não induz produção de IFN γ , IL-4 e IL-10, expressão de CD69, CD25, FOXP3, ROR γ T, Tbet e GATA3 nos linfócitos, além de não induzir a linfoproliferação. No entanto, o pré-tratamento por 24 horas com BAY 41-2272, tem um efeito inibitório na produção IFN γ , na expressão de CD69, CD25 e Tbet e na linfoproliferação.

5. DISCUSSÃO

Nosso grupo tem se dedicado ao estudo de alternativas para o tratamento de pacientes com IDPs e imunopatologias. Recentemente, demonstramos que células THP-1 e monócitos do sangue periférico são ativados quando tratados com BAY 41-2272 aumentando: nível intracelular de cGMP e cAMP; liberação de ânion superóxido (O_2^-); expressão dos genes *CYBB* e *NCF2*; respostas fagocíticas e microbidas; liberação de TNF- α e IL-12p70. Esses dados sugerem que o BAY 41- 2272 e/ou sua via podem ser utilizados para a modulação positiva do sistema imunológico e eventual controle de infecções em indivíduos imunocomprometidos (Oliveira-Junior EB, et al, 2007; Soeiro-Pereira PV, et al, 2010).

O BAY 41-2272 (5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine) é um fármaco derivado da pirazolopirina e foi desenvolvido como um ativador de guanilato ciclase solúvel (GCs) independente de óxido nítrico (NO). A GCs é uma enzima de transdução de sinal amplamente distribuída que, sob a ativação pelo óxido nítrico, leva ao acúmulo do segundo mensageiro GMPc. Este regula diferentes aspectos da função celular via interação com diversas quinases, canais de íons e fosfodiesterases (PDEs) (Evgenov OV et al, 2006; Derbyshire ER e Marletta MA, 2012). No contexto da resposta imunológica o GMPc participa de vários processos, como diferenciação, quimiotaxia e proliferação celular, além da liberação de mediadores solúveis (Ciuman M et al, 2006).

No presente trabalho temos como objetivo, avaliar o potencial do BAY 41-2272, agonista da guanilato ciclase solúvel, e sua via, como uma ferramenta para a modulação da função dos linfócitos. Dessa forma, para evidenciar o papel do BAY 41-2272 na ativação dos linfócitos, analisamos a produção de citocinas, um importante indicador do tipo e grau da resposta induzida por estímulos específicos.

Os linfócitos T CD4 são classificados funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem. Existem quatro subtipos principais de linfócitos descritos na literatura: Th (T *helper*) 1, Th2, Th17 e Treg (T reguladora). Sabemos que as células Th1 produzem, principalmente, Interferon- γ (IFN- γ) e são necessárias para eliminar os patógenos intracelulares (Cope A, et al, 2011; Hirahara K, et al, 2013). Já as células Th2 produzem, principalmente, interleucina-4 (IL-4) e estão envolvidas na produção de anticorpos, nas

respostas imunes contra parasitas extracelulares e hipersensibilidade, incluindo eosinofiloiose (Bonilla e Oettgen, 2010).

Um outro grupo de células T são as células T reguladoras (T reg). Estas estão envolvidas na manutenção da tolerância periférica através da supressão da ativação e expansão de células T autorreativas (Gorantla et al, 2010). Estas células atuam pela indução de morte por citólise dependente de granzima A, granzima B e perforina, privação de AMPc, supressão de maturação das células dendríticas e produção de citocinas inibitórias como interleucina-10 (IL-10) (Vignali et al., 2008; Cope et al., 2011). Nesse contexto, o BAY 41-2272, como forma direta de ativação, não induziu a produção das citocinas como, IFN- γ , IL-4, IL-10 (**Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15**). No entanto o pré-tratamento por 24 horas com diferentes doses do BAY 41-2272 e posterior ativação com PMA e Ionomicina ou IL-12, demonstrou que este fármaco não altera o perfil de produção de IFN- γ pelos linfócitos, mas inibe a produção de IL-4 e IL-10 (**Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21**).

Diversos estudos vem sendo desenvolvidos para melhor compreensão da ativação via da guanilato ciclase solúvel em linfócitos. Estudos prévios demonstraram que a ativação da GCs por baixos níveis de NO aumenta seletivamente a diferenciação e expansão das células Th1 em modelo murino (Niedbala W et al, 2002; Niedbala W et al, 2007). Evidências estas que suportam os nossos achados em relação ao pré-tratamento por 24 horas com o BAY 41-2272.

No entanto, outro grupo demonstrou que o NO modula a expressão de citocinas em linfócitos T humanos (Roozendaal R et al, 1999). Além disso, também foi demonstrado que o NO induz a diferenciação de uma população de células T reguladoras que são similares às Treg naturais em modelo murino (Niedbala W et al, 2007). Dessa forma, achamos que o tratamento com PMA adicionado de Ionomicina poderia estar mascarando um eventual efeito do BAY 41-2272 nestas células. Neste caso, os estímulos gerarariam uma super ativação e, assim, interefeririam no efeito do fármaco nos linfócitos. Nesse contexto, avaliamos o efeito do pré-tratamento com este fármaco e posterior ativação com 90nM e 30 nM de PMA sem a adição de Ionomicina. Foi observado que o pré-tratamento com o BAY 41-2272 inibiu de forma significativa a ativação e liberação de IFN γ pelos linfócitos, por 24

horas, comparado ao controle pós-ativado com 90nM de PMA. (**Figura 23 e 24**).

Além dos tratamentos já descritos, nós adicionamos o ODQ, que inibe a via da guanilato ciclase solúvel de forma irreversível. O tratamento com o ODQ, atuando de forma diferente do esperado, não bloqueou a ação do BAY 41-2272, ou seja, o fármaco manteve sua ação negativa sobre a liberação do IFN γ . Desse modo, supomos que o BAY 41-2272 atua por outras vias, além da via da guanilato ciclase solúvel (**Figura 21 e 22**).

Em vista do efeito inibitório na produção de citocinas ocasionado pelo tratamento com BAY 41-2272, avaliamos a expressão de CD69, uma lectina tipo C que é induzida nos estágios iniciais de ativação dos leucócitos (De la Fuente H. et al 2014). Este fármaco não induziu a expressão de CD69 nas populações de linfócitos T CD4 ou T CD8 (**Figura 26**). Além disso, o pré-tratamento com este fármaco não inibiu a expressão de CD69 na população de linfócitos T CD8 e na população de linfócitos T CD4 que foram pré-tratadas com a dose de 3 μ M (**Figura 27 e Figura 28A**). No entanto, a população de linfócitos T CD4 que foram pré-tratadas com 30 μ M de BAY 41-2272 e posteriormente ativadas com PMA e Ionomicina, mostraram uma diminuição da expressão de CD69 (**Figura 28B**). Também realizamos os tratamentos com os inibidores da via da guanilato ciclase solúvel (GCs), ODQ e W45, não recuperaram a expressão de CD69, confirmando o resultado das dosagens de citocinas, sugerindo que BAY 41-2272 na dose de 30 μ M tem um papel inibitório independente da GMPc.

Diversos estudos demonstraram um papel regulatório do óxido nítrico (NO) nas células T. Altas doses de NO podem ter efeito citotóxico, no entanto, baixas doses podem influenciar na ativação, proliferação e diferenciação do linfócitos (Niedbala W, Cai B e Liew FY, 2006). Estudos mostraram que o aumento de quimiocinas e iNOS leva a uma atenuação da resposta das células T (Wink DA, Hines HB, Cheng RYS et al, 2010), o que corrobora, em parte, com os resultados encontrados neste trabalho, onde uma alta dose de BAY 41-2272 inibe a ativação dos linfócitos T CD4 humanos, e, aparentemente, esta subpopulação celular demonstra ser mais sensível as concentrações de NO que as células T CD4 murinas (Niedbala W, Cai B e Liew FY, 2006).

O NO possui um papel paradoxal na resposta imune, ora pró-inflamatório, ora levando a supressão da ativação celular. Diversos estudos demonstram o papel do NO na diferenciação das células T. Concentrações intermediárias de SNAP (doador de NO) estimulam o desenvolvimento de células T CD4 produtoras de IFN γ (Th1), na presença de IL-12 e anti-IL4, sem alterar a população Th2 (Bogdan C, 2011; Pearl JE et al, 2012). Por um tempo, pensava-se que as células T CD4 eram delimitadas a duas principais subpopulações, células Th1 e Th2 (Hirahara K, Nakayama T, 2016). Dessa forma avaliamos o efeito do BAY 41-2272 na expressão de Tbet e GATA3.

O tratamento não induziu a expressão de Tbet ou GATA3 nas populações de linfócitos (**Figuras 39 e 40**). Também observamos que o pré-tratamento com este fármaco não mostrou diferença estatística significativa na expressão GATA3 nas populações de linfócitos (**Figura 40**). De forma diferente da literatura, observamos uma inibição da expressão de Tbet após o pré-tratamento com o BAY 41-2272 (**Figura 39**), sugerindo que este fármaco não induz a diferenciação de linfócitos, mas consegue inibir a expressão de fatores de transcrição relacionados à diferenciação celular.

Recentemente, foi demonstrado que o NO induz uma população de células T regulatórias, que tem perfil de marcadores característicos (CD25⁺, CD27⁺, FOXP3⁻, GITR⁺, Tbet^{low}, GATA3^{high}), mas similares à células T reguladoras naturais (Bogdan C, 2011). Dessa forma avaliamos o efeito do BAY 41-2272 na expressão de FOXP3 e CD25.

O tratamento não induziu a expressão de FOXP3 ou CD25 nas populações de linfócitos (**Figuras 30 e 36**). Também observamos que o pré-tratamento com este fármaco não mostrou diferença estatística significativa na expressão de FOXP3 nas populações de linfócitos T CD4 e T CD8 (**Figura 32 e 33**). De forma diferente da literatura, não observamos o aumento da expressão de CD25 na população de linfócitos T CD4 após o pré-tratamento com o BAY 41-2272 (**Figura 37**), sugerindo que este fármaco não induz a diferenciação de linfócitos, mas consegue inibir através da estimulação da via por ele ativada.

Alguns estudos mostraram que o NO é necessário para a indução e estabilidade da resposta Th17 (Obermajer N et al, 2013). Em contraste, foi demonstrado que o NO regula negativamente a diferenciação Th17 de

células T murinas e humanas (Niedbala et al, 2011; Yang J et al, 2013). Além disso, foi demonstrado que camundongos deficientes para CD69 aumentam a capacidade de diferenciar para células Th17 (Martín et al. 2010). Como observamos uma inibição da expressão de CD69 pelo BAY 41-2272, associado ao fato do NO ser capaz de modular a resposta Th17, avaliamos o efeito deste fármaco na expressão de ROR γ T, fator de transcrição que induz uma resposta Th17, nos linfócitos T. O tratamento não induziu à expressão de ROR γ T nas populações de linfócitos T CD8 ou T CD4 (**Figura 31**). Também observamos que o pré-tratamento com este fármaco e posterior estimulação com PMA e Ionomicina não mostrou diferença estatística significativa na expressão ROR γ T nas populações de linfócitos T CD4 e T CD8 (**Figura 34 e 35**).

O processo de ativação dos linfócitos T inicia-se com o reconhecimento peptídeo-MHC pelo TCR associado a sinalização de moléculas co-estimuladoras bem como as citocinas e quimiocinas presentes no microambiente. Sabe-se que a resposta do reconhecimento do antígeno pelo linfócito T é caracterizada por uma série de divisões, denominadas expansão clonal ou linfoproliferação (Yates AJ, Chan CCT, Callard RE, 2006). Assim, avaliamos o efeito do BAY 41-2272 na proliferação celular. Para isso usamos a fitohemaglutina, um mitógeno que induz a ativação policlonal e mimetiza a ativação e proliferação celular. Observamos que o tratamento com BAY 41-2272 não induziu a linfoproliferação (**Figura 41A**), no entanto o pré-tratamento com este fármaco inibiu o crescimento celular (**Figura 41B**), demonstrando, mais uma vez, a capacidade inibitória deste medicamento sob os linfócitos.

Para melhor observar os efeitos da via da guanilato ciclase solúvel nos linfócitos, repetimos a expressão de CD69, marcador de ativação inicial, com os controles da via, como 8Br-cGMP (análogo de GMPc) e SNAP (doador de óxido nítrico). Os resultados obtidos com o BAY 41-2272 foram reproduzidos novamente (**Figura 42B**). O pré-tratamento com SNAP mostrou inibir a expressão de CD69 (**Figura 42B**), no entanto o 8BR-cGMP não inibiu essa expressão, sugerindo que o BAY 41-2272 age de forma dependente de GCs mas independente de GMPc.

A ativação da via da GCs leva a produção de GMPc, um importante mediador que regula diversas funções celulares. Uma vez produzido, o GMPc pode ser rapidamente hidrolisado pelas PDEs e exerce sua função através de proteínas quinases, principalmente PKG-I e PKG-II (PKG “*protein kinase G*”), que compartilham diversos alvos com a proteína quinase A (PKA do inglês “*protein kinase A*”) (Tuttle TR et al, 2015). Como trabalhamos com a via BAY 41-2272-GCs-GMPc, avaliamos a produção de GMPc. Observamos produção de GMPc após estímulo com BAY 41-2272 (**Figura 38**), demonstrando que os efeitos observados são dependentes da ativação da via da guanilato ciclase solúvel.

Nosso grupo vem buscando alternativas para o tratamento de pacientes com imunodeficiências primárias. As imunodeficiências primárias representam erros congênitos do sistema imune que predispõem a infecções recorrentes e/ou crônicas, autoimunidade, alergia, câncer e outras manifestações de desregulação imunológica (Dropulic, 2011). Estas doenças podem envolver elementos da imunidade inata como os fagócitos mononucleares, polimorfonucleares, células NK e proteínas do sistema complemento, ou da imunidade adquirida, como os linfócitos T e B.

Os defeitos moleculares nas células T levam ao desenvolvimento de diversas doenças e predispõem a um amplo espectro de infecções. Entre as imunodeficiências primárias de linfócitos T existem algumas doenças específicas que resultam em uma susceptibilidade a um patógeno em particular como a Síndrome Linfoproliferativa ligada ao X (XLP), a qual resulta em uma falha no controle da proliferação das células T ou NK ativadas que surgem após infecção do vírus Epstein-Barr (EBV) (Dropulic LK e Cohen JI, 2011).

Além das síndromes linfoproliferativas, as manifestações autoimunes também podem se apresentar como um componente relacionado às imunodeficiências primárias. A síndrome IPEX (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked*) e a APECED (*Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis, ectodermal dysplasia*) são exemplos dessas doenças. A síndrome IPEX é resultante da deficiência do fator de transcrição FOXP3, que está envolvido na regulação da resposta imune aos antígenos próprios. A APECED resulta na deficiência da proteína AIRE, responsável

pela seleção negativa dos linfócitos T no timo, gerando uma autoimunidade e susceptibilidade aumentada a candidíase (Gupta S, Louis AG, 2013).

Atualmente, apesar dos avanços obtidos na caracterização e diagnóstico, essas doenças ainda representam um desafio, pois o diagnóstico precoce e o tratamento adequado é essencial para prevenir a morbidade, mortalidade e sequelas associadas a essas doenças. O transplante de medula óssea (TMO) é o principal tratamento para imunodeficiências de linfócitos T associada ou não com a deficiência de linfócito B. No entanto, o TMO está longe de ser perfeita e pode gerar sérios efeitos adversos, como a doença do enxerto *versus* hospedeiro, dessa forma se faz necessário a busca por tratamentos mais benéficos e com menores efeitos adversos.

De forma diferente dos dados anteriormente obtidos pelo nosso laboratório com monócitos/macrófagos (Oliveira-Junior EB, et al, 2007; Soeiro-Pereira PV, et al, 2010), nossos resultados sugerem que este fármaco tem um efeito inibitório na produção das citocinas pelos linfócitos. Também demonstrou atuar de forma dependente de GCs e independente de GMPc e inibir a ativação celular sem alterar a expressão de fatores de transcrição como, FOXP3, ROR γ T, GATA3, e inibindo a expressão de Tbet e a linfoproliferação. Juntos, estes dados sugerem que o BAY 41-2272 pode ser utilizado como imunomodulador em pacientes com sistema imunológico comprometido e síndromes linfoproliferativas.

6. CONCLUSÕES

O tratamento com BAY 41-2272 não induziu a produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10, no entanto o pré-tratamento com este fármaco apresenta potencial imunomodulador sobre os linfócitos.

O BAY 41-2272 não induziu a expressão de CD69 nos linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8.

O pré-tratamento com BAY 41-2272 não inibiu a expressão de CD69 no linfócitos T CD8.

O pré-tratamento com a dose de 30 μ M de BAY 41-2272 inibiu a expressão de CD69 no linfócitos T CD4.

O BAY 41-2272 não induziu a expressão de CD25 nos linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8.

O pré-tratamento com a dose de 30 μ M de BAY 41-2272 inibiu a expressão de CD25 nos linfócitos T CD4.

O BAY 41-2272 não induziu expressão dos fatores de transcrição FOXP3, ROR γ T, Tbet e GATA3

O pré-tratamento com BAY 41-2272 não inibiu expressão dos fatores de transcrição FOXP3, ROR γ T e GATA3 nos linfócitos.

O pré-tratamento com 30 μ M BAY 41-2272 inibiu expressão do fator de transcrição Tbet nos linfócitos.

O BAY 41-2272 não induziu a linfoproliferação linfócitos.

O pré-tratamento com BAY 41-2272 inibiu a proliferação dos linfócitos.

Nossos dados sugerem que o BAY 41-2272, agonista de guanilato ciclase solúvel, tem ação inibitória na ativação, produção de citocinas e proliferação dos linfócitos.

REFERÊNCIAS

Boerrigter G et al. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension*. 2007 May;49(5):1128-33.

Bogdan C. Regulation of Lymphocytes by Nitric Oxide. *Metho Mol Biol*. 677, 2011.

Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptative immunity: an update. *Trends Immunol*. 2015 Mar;36(3):161-78.

Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptative immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S33-40..

Chaplin DD. Overview of th immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23.

Ciuman M, Siednienko J, Czyzyk R et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase and soluble guanylyl cyclase disappear in elicited rat neutrophils. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(11):1618-23.

Conran N et al. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms on vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. *Br J Pharmacol*. 2001 Oct;134(3):632-8.

Cope A, Le Friec G, Cardone J e Kemper C . The Th1 life cycle: molecular controlo of IFN-gamma to IL-10 switchin. *Trends Immunol*. 2011;32(6):278-86.

Cosyns SMR, Lefebvre RA. Mechanism of relaxation and interaction with nitric oxide of the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in mouse gastric fundus and colon. *Eur J Pharmacol*. 2012 Jul 5;686(1-3):104-15.

De la Fuente H, Cruz-Adalia A, Hoyo GM et al. The Leukpcyte Activation Receptor CD69 Controls T Cell Differentiation through its Interaction with Galectin-1. *Mol and Cell Biology*. 2014;34(13):2479-2487.

Derbyshire ER, Marletta MA. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:533-59.

Dropulic LK e Cohen JL. Severe viral infections and primary immunodeficiencies. *Clin Infect Dis.* 2011;53(9):897-909.

Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM et al. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: Discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9):755-68.

Fischer A, Hacein-Bey-Abina S e Cavazzana-Calvo M. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol.* 2010 Jun;11(6):457-60.

Fomin ABF et al. DiGeorge Syndrome: a not so rare disease. *Clinics.* 2010;65(9):856-869.

Gorantla VS, Schneeberger S, Brandacher G, et al. T regulatory cells and transplantation tolerance. *Transplant Rev.* 2010;24:147-59.

Gupta S, Louis GA. Tolerance and autoimmunity in primary immunodeficiency disease: a comprehensive review. *Clin Rev Allerg Immunol.* 2013 Oct;45(2):162-9.

Hirahara K, Poholek A, Vahedi G et al. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: Implications for immune-mediated disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 May;131(5):1276-87.

Hirahara K e Nakayama T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol.* 2016 Apr;28(4):163-71.

Martín P, Gómez M, Lamana A et al. CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2010. 30:20;4877-4889

Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):933-44.

Nakayama T, Yamashita M. The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation. *Semin Immunol*. 2010 Oct;22(5):303-9.

Niedbala W, Wei X@, Campbell C et al. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selective up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. 2002 Dec 10;99(25):16186-91.

Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis*. 2006 Nov;65 Suppl 3:iii37-40.

Niedbala W, Cai B, Liu H et al. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15478-83.

Niedbala W, Alves-Filho JC, Fukada SY et al. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *PNAS*. 2011;108:22;9220-9225.

Obermajer N, Wong JL, Edwards RP et al. Induction and stability of human Th17 cells requires endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. *J. Exp. Med*. 2013 210:7;1433-1445.

Oestreich KJ, Weinmann AS. T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress transcription. *Trends Immunol*. 2012 Feb;33(2):78-83.

Oliveira-Junior EB, Thomazzi SM, Rehder J et al. Effects of BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase, on human NADPH oxidase system from THP-1 cells. *Eur J Pharmacol*. 2007;567(1-2):43-49.

Pearl JE, Torrado E, Tighe M et al. Nitric oxide inhibits the accumulation of CD4⁺CD44^{hi}Tbet⁺CD69^{lo} T cells in mycobacterial infection. *Eur. J. Immunol.* 2012. 42: 3267-3279.

Romagnani S et al. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol.* 2009 Nov;47(1):3-7.

Roozendaal R, Vellenga R, Postma DS et al. Nitric oxide selectively decreases Interferon- γ expression by activated human T lymphocytes via cGMP-independent mechanism. *Immunology.* 1999 Nov; 98(3):393-399.

Saxena A et al. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011 Dec 1;585(23):3758-63.

Shrikant PA et al. Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunol Res.* 2010 46:12-22.

Soeiro-Pereira PV, Falcai A, Kubo CA et al. BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase agonist, activates human mononuclear phagocytes. *Br J Pharmacol.* 2010;166(5):1617-30.

Stasch JP et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001 Mar8;410(6825):212-5.

Strioga M et al. CD8⁺ CD28⁻ and CD8⁺ CD57⁺ T cells and their role in health and disease. *Immunology.* 2011 Sep;134(1):17-32.

Stritesky GL et al. The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development. *Immunity.* 2010 Jan 28;34(1):39-49.

Thomazzi SM et al. Role of cyclic GMP on inhibition by oxide donors of human eosinophil chemotaxis in vitro. *Br J Pharmacol.* 2004 Feb;14(4):653-60.

Thomazzi SM et al. Inhibitory effects on human eosinophil chemotaxis in vitro by BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol*. 2005 Mar 15;69(6):875-82.

Tsai HY et al. X-linked hyper-IgM syndrome with CD40LG mutation: two case reports and literature review in Taiwanese patients. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015 Feb;48(1):113-8.

Turvey SE, Bonilla FA e Junker AK. Primary immunodeficiency diseases: a practical guide for clinicians. *Postgrad Med J*. 2009;85:660-666.

Turvey SE, Broide DH. Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24-32.

Tuttle TR, Mierzwa ML, Wells SI et al. The cyclic GMP/protein kinase G pathway as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2016 Jan 28;370(2):279-85.

Vignali DAA, Collison LW, Workam CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;(8):523-32.

Wink DA, Hines HB, Cheng RYS et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc. Biol*. 89: 873-891;2011.

Yang J, Zhang R, Lu G et al. T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *J. Exp. Med*. 2013 210:7;1447-1462.

Yates AJ, Chan CCT, Callard RE. Modelling T cell activation, proliferation and homeostasis. Paton R, McNamara LA. *Multidisciplinary Approaches to Theory in Medicine*. Elsevier, 2005, 16; 281-308.