

PAULO VÍTOR SOEIRO PEREIRA

**BAY 41-2272: UMA FERRAMENTA FARMACOLÓGICA COM
POTENCIAL PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES**

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
2012

PAULO VÍTOR SOEIRO PEREIRA

BAY 41-2272: uma ferramenta farmacológica com potencial para o tratamento de infecções

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
2012

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

© reprodução total

Pereira, Paulo Vítor Soeiro.

BAY 41-2272: uma ferramenta farmacológica potencial para o tratamento de infecções / Paulo Vítor Soeiro Pereira. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia aplicada, farmacologia, infecções.

Versão do título para o inglês: BAY 41-2272: a potential pharmacological tool to treat infections.

1. Imunologia 2. Imunologia celular 3. Imunomoduladores I. Condino Neto, Prof. Dr. Antonio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0172/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Paulo Vítor Soeiro Pereira.

Título da Tese: BAY 41-2272: uma ferramenta farmacológica potencial para o tratamento de infecções.

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

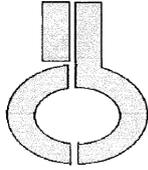
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 29 de outubro de 2008.

PARECER 862/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 89ª reunião realizada em 24.10.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "BAY 41-2272: Uma ferramenta farmacológica potencial para o controle de infecções em imunodeficientes".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

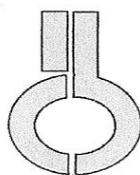
Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **24 de outubro de 2009.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
PAULO VITOR SOEIRO PEREIRA
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP



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) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **136** nas fls. **110** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Antônio Condino Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Bay 41-2272: Uma ferramenta farmacológica potencial para o controle de infecções em imunodeficientes*" do qual participam o(s) aluno(s) **Paulo Vítor Soeiro Pereira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **03.11.2011, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 07 de novembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho...

...à minha mãe, Maria José, por todo o amor, incentivo e compreensão. Muito obrigado por me ensinar a lutar pelos meus sonhos, me mostrando que vale a pena transpor obstáculos para conquistá-los.

...ao meu pai, José Paulo, modelo de dedicação profissional, de justiça e de honestidade. Por todo o amor dedicado à família e pelo apoio e incentivo constantes para a realização dos meus sonhos.

...aos meus irmãos, Ana Marina e Leonardo (Léo), por todos os momentos de convivência, palavras e gestos de apoio nos momentos que precisei, e pela inspiração que são para mim.

...aos meus avós, que foram sempre alicerce para todas as nossas conquistas.

...aos meus tios, tias, primos e primas, que sempre me deram apoio e carinho ao longo desta e de qualquer caminhada.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha amada esposa, Angela...

...pelo amor e compreensão, compartilhando com dedicação e paciência o final de mais uma etapa importante de minha vida.

...pelo conforto e carinho nos momentos de angústia.

...pela companhia que me completa e me presenteia nos momentos mais alegres da minha vida.

Ao meu amado filho, Paulo Gabriel...

...pelos incontáveis “papai, te amo”.

...pelo sorriso carinhoso, que tira a minha dor e cura qualquer cansaço.

...por me deixar, mesmo sem querer, ser o seu “super-herói”.

...por me tornar a cada dia uma pessoa melhor.

Obrigado por tudo!!! Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto pela orientação segura e paciente que possibilitou a realização deste trabalho... Por acreditar que poderia fazer algo importante... Pela convivência e amizade sincera que me fizeram crescer não só como profissional, mas como pessoa.

Aos amigos de hoje e sempre...

...Christina Kubo e Silvana Lucchini, pela amizade constante, ajuda, carinho e cuidado maternos sempre presentes. E por todos os ensinamentos técnicos e pessoais possíveis e imagináveis.

...Angela, Otávio, Marília, Sandro, Marina, Nuria (La Furia Argentina), José Antônio ("o" Zé), Patrícia (Patty) pela companhia, brincadeiras, viagens (para novos lugares e sem sair do lugar) e por todos os ensinamentos fundamentais para meu crescimento pessoal e como pesquisador. Muito obrigado pelo auxílio experimental, "psicológico" e pela grande amizade.

...Walmir, Stefanie, Lena, Taj, Paula, sempre dispostos a auxiliar e por todos os momentos de convívio.

...Edgar (Mr. Ed), Julieta, Rafael, que, mesmo de longe, sempre alegam a todos.

À Profa. Dra. Flávia Raquel, eterna amiga, a quem devo meu início e minha continuação nesta caminhada cansativa e corrida, mas maravilhosa e cheia de boas surpresas que é a pesquisa. Muito obrigado por continuar a nos inspirar.

Aos professores Dra. Paulina Sannomiya, Dr. Joílson Martins e Dr. Anderson Sá, pela colaboração na análise e confecção deste trabalho, como também na minha formação. Suas sugestões e críticas foram fundamentais para o aperfeiçoamento da minha pesquisa.

Aos companheiros pós-graduandos de todos os andares e laboratórios, pelo apoio, auxílio, *happy hours* e amizade construída.

À Eni, Jotelma e João por todos os "galhos quebrados" e pelo profissionalismo.

Ao Miton (Miltovisky), Otacílio e Moisés, pela alegria a nos ajudar todos os dias.

Aos eternos amigos e "irmãos" Lúcio Flávio, Thiago e Luís Carlos, pela inesquecível convivência, pelos grandes momentos e pela criatividade contagiante e inspiradora.

Às grandes amigas Pollyanna, Priscylla e Monique, por todos os ótimos momentos (apesar de cada vez mais raros).

Aos amigos do LIF, por quem guardo eterno carinho, estima e muita saudade.

Aos funcionários da Biblioteca que contribuíram na revisão textual e suporte para confecção dessa tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro, sem o qual não haveria possibilidade da realização dessa tese.

E a todos, aqui não citados, que de forma direta ou indireta contribuíram para concretização deste trabalho.

Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.

(Dalai Lama)

RESUMO

Pereira PVS. BAY 41-2272: uma ferramenta farmacológica com potencial para o tratamento de infecções. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Pacientes com defeitos congênitos no número e/ou função de fagócitos mononucleares apresentam uma série de infecções bacterianas e/ou fúngicas. O tratamento dessas patologias baseia-se na terapia com antimicrobianos, transplante de medula óssea e, em alguns casos, administração de IFN- γ . Buscando uma alternativa para recompor ou compensar falhas nos mecanismos efetores de monócitos, investigamos o potencial do agonista de Guanilato Ciclase solúvel (GCs), BAY 41-2272, sobre a diferenciação e ativação dessas células. Para tanto avaliamos *in vitro* linhagens mielomonocíticas (THP-1 e U937) e monócitos humanos (PBM) de indivíduos saudáveis e imunodeficientes - Doença Granulomatosa Crônica (DGC) e deficiência de mieloperoxidase (MPO) - tratados com o fármaco em questão. O BAY 41-2272 alterou o fenótipo das células THP-1 e monócitos, aumentando a expressão de CD11b, CD18, CD14, TLR4, TLR2 e CD163, moléculas fundamentais para adequada resposta à patógenos. Essa diferenciação mostrou envolver um perfil pró-inflamatório, uma vez que o BAY 41-2272 aumentou a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12p70. Além desses mecanismos, o fármaco ativou o sistema NADPH oxidase, aumentando a expressão gênica (*CYBB*, *CYBA* e *NCF2*) e protéica (p67^{PHOX} e gp91^{PHOX}) dos seus componentes. Uma vez que muitas dessas respostas dependem da ativação do fator de transcrição NF- κ B, mostramos que o BAY 41-2272 aumenta a degradação de I κ B α e a fosforilação de NF- κ B (p65) de forma dependente de PKG. Além disso, o *priming* dos monócitos (células U937) induzido pelo fármaco depende desse fator de transcrição. Confirmando seu potencial em compensar falhas na resposta imune, o BAY 41-2272 aumentou a atividade microbicida a *S. aureus* e *C. albicans* de monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO. Para estudar a ação do fármaco em um sistema complexo, avaliamos seus efeitos em modelo animal. O tratamento intraperitoneal induziu intensa migração celular para essa cavidade, principalmente de macrófagos, desde as primeiras horas. Ainda, acentuou o efeito inflamatório da carragenina aplicada na pata. O tratamento potencializou o espriamento, atividade fagocítica, atividade microbicida, produção espontânea de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio induzida por PMA, de forma *ex vivo* em macrófagos peritoneais. E mais importante, o BAY 41-2272 aumentou a proteção e sobrevivência de camundongos desafiados com *C. albicans*, confirmando seu potencial para o tratamento de infecções. Em conjunto, nossos resultados mostraram que o BAY 41-2272 promove a diferenciação e ativação de monócitos, de forma dependente de NF- κ B, induzindo um perfil altamente responsivo no contexto do reconhecimento e resposta à patógenos. Esses dados confirmam o potencial do BAY 41-2272 e sua via (GCs / PKG / NF- κ B) como uma alternativa a ser explorada em seus aspectos translacionais na busca por novas terapias destinadas ao controle de infecções, principalmente no caso das imunodeficiências.

Palavras-chave: BAY 41-2272. Guanilato ciclase solúvel. Monócitos. NF- κ B. Infecção. Imunodeficiências primárias.

ABSTRACT

Pereira PVS. BAY 41-2272: a potential pharmacological tool to treat infection. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Defects in monocytes number or function leads to several bacterial and fungal infections. The treatment of these disorders is based on the antimicrobial therapy, bone marrow transplantation and, in some cases, administration of IFN- γ . In this work, we investigated the soluble guanylate cyclase (sGC) agonist, BAY 41-2272, as an alternative to promote cell differentiation and activation, restoring or compensating the failures on monocyte effector mechanisms. We evaluate myelomonocytic cell lines (THP-1 and U937) and human monocytes (PBM) from healthy and immunodeficient individuals - Chronic Granulomatous Disease (CGD) and myeloperoxidase deficiency - treated with BAY 41-2272. This drug altered the phenotype of THP-1 cells and monocytes, increasing the expression of CD11b, CD18, CD14, TLR4, TLR2 and CD163, essential molecules for appropriate response to pathogens. This monocyte differentiation includes an induction to a pro-inflammatory profile, since BAY 41-2272 increased TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-12p70 release. In addition to these mechanisms, the drug activates the NADPH oxidase system, increasing gene (*CYBB*, *CYBA* and *NCF2*) and protein (p67^{PHOX} and gp91^{PHOX}) expression of its components. Since many of these responses depend on NF- κ B pathway activation, we showed that BAY 41-2272 increases a PKG-dependent degradation of I κ B α and phosphorylation of NF- κ B (p65). Moreover, BAY-induced priming of monocytes (U937) is NF- κ B dependent. BAY 41-2272 increased microbicidal activity against *S. aureus* and *C. albicans* by monocytes from patients with CGD and MPO deficiency, confirming its potential to compensate immune response failure. To study the action of this drug in a complex system, we evaluated its effects in an mice model. The intraperitoneal treatment induced intense macrophage migration to peritoneum, since the first hour. Still, potentiate the inflammatory effect of carrageenan. The ex vivo peritoneal macrophage treatment increased the spreading, phagocytic activity, microbicidal activity, spontaneous production of nitric oxide and PMA-induced hydrogen peroxide release. More importantly, BAY 41-2272 increased the protection and survival of mice challenged with *C. albicans*, confirming its potential to treat infections. Taken together, our results showed that BAY 41-2272 promotes NF- κ B-dependent monocytes differentiation and activation, inducing a highly responsive profile in the context of recognition and response to pathogens. These data confirm the potential of BAY 41-2272 and its pathway (sGC / PKG / NF- κ B) as an alternative to be explored in the search for new therapies to control infection, especially in immunodeficiencies.

Keywords: BAY 41-2272. Soluble Guanylate Cyclase. Monocytes. NF- κ B. Infection. Primary Immunodeficiency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Receptores importantes para fagocitose	26
Figura 2 - Resposta dos fagócitos mononucleares	29
Figura 3 - Vias de ativação do NF- κ B.....	31
Figura 4 - Estrutura, sítio de ligação e funções conhecidas do BAY 41-2272	35
Figura 5 - Sequência de experimentos realizados com células THP-1, U937 e monócitos humanos	41
Figura 6 - BAY 41-2272 induz a expressão de CD11b, CD18, CD14, TLR4, TL2 e CD163 em monócitos de sangue periférico	60
Figura 7 - BAY 41-2272 induz a expressão de CD18, TLR4, TL2 e CD163 em células THP-1.....	61
Figura 8 - BAY 41-2272 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias por PBM	62
Figura 9 - BAY 41-2272 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias por células THP-1	63
Figura 10 - BAY 41-2272 aumenta a expressão do gene <i>CYBA</i> e <i>NCF2</i> , mas não <i>NCF1</i> em células THP-1 e PBM.....	65
Figura 11 - BAY 41-2272 aumenta a expressão protéica de p67 ^{PHOX} , mas não de p22 ^{PHOX} e p47 ^{PHOX}	68
Figura 12 - BAY 41-2272 aumenta a expressão protéica de gp91 ^{PHOX}	69
Figura 13 - Tratamento com BAY 41-2272 induz a degradação de I κ B α em monócitos e células THP-1	71
Figura 14 - Tratamento com BAY 41-2272 induz a fosforilação de NF- κ B em monócitos e células THP-1	73
Figura 15 - BAY 41-2272 ativa NF- κ B, pré-estimulando o sistema NADPH oxidase em células U937.....	75
Figura 16 - BAY 41-2272 induz a expressão de <i>CYBB</i> e <i>NCF2</i> via NF- κ B.....	76
Figura 17 - BAY 41-2272 potencializa a atividade fagocítica de PBM de pacientes com DGC e deficiência de MPO	79
Figura 18 - BAY 41-2272 aumenta a produção de O ₂ ⁻ por PBM de pacientes com deficiência de MPO	81
Figura 19 - BAY 41-2272 aumenta a produção de H ₂ O ₂ por PBM de pacientes com deficiência de MPO	83

Figura 20 - BAY 41-2272 potencializa a atividade microbicida de PBM de pacientes com DGC e deficiência de MPO	84
Figura 21 - Sequência de experimentos realizados com camundongos.....	90
Figura 22 - Tratamento intraperitoneal (i.p) com BAY 41-2272 induz o influxo de macrófagos para essa cavidade	101
Figura 23 - Tratamento intraperitoneal (i.p.) com BAY 41-2272 não influencia no número de células do baço, medula óssea e linfonodo mesentérico.....	102
Figura 24 - Tratamento intraperitoneal com BAY 41-2272 aumenta a atividade inflamatória em modelo de edema de pata induzido por carragenina	103
Figura 25 - Tratamento com BAY 41-2272 pré-ativa os macrófagos peritoneais aumentando o espriamento e atividade fagocítica.....	104
Figura 26 - BAY 41-2272 aumenta a geração <i>ex vivo</i> de H ₂ O ₂ induzida por PMA e a produção espontânea de NO por macrófagos peritoneais.....	105
Figura 27 - Tratamento intraperitoneal com BAY 41-2272 aumenta a sobrevivência de animais infectados por <i>C. albicans</i> , mas não por <i>S. aureus</i>	106
Figura 28 - Tratamento intraperitoneal e intralesional com BAY 41-2272 diminui a infecção local por <i>C. albicans</i> , mas não por <i>S. aureus</i>	107
Figura 29 - BAY 41-2272 aumenta a atividade microbicida <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características dos participantes da pesquisa	43
Quadro 2 - Estímulos utilizados para a ativação das células THP-1, U937 e PBM .	46
Quadro 3 - Marcadores de superfície avaliados por citometria de fluxo	47
Quadro 4 - Reagentes e condições usados para reação de transcrição reversa	50
Quadro 5 - Relação de <i>primers</i> ¹ utilizados	50
Quadro 6 - Reagentes e ciclos utilizados para reação de PCR em tempo real	50
Quadro 7 - Componentes do sistema NADPH oxidase avaliados por <i>Western Blot</i>	52
Quadro 8 - Anticorpos utilizados para avaliação da via NF- κ B	54
Quadro 9 - Estímulos utilizados para tratamento dos animais	91

LISTA DE ABREVIATURAS

AS	do inglês <i>Angeli's salt</i>
ATP	adenosina Trifosfato
BAY	BAY 41-2272
CR	receptor do complemento, do inglês <i>complement receptor</i>
DAG	diacilglicerol
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DNA	do inglês <i>desoxiribonucleic acid</i>
ERO	espécies reativas de oxigênio
FcγR	receptor da região Fc do anticorpo IgG, do inglês <i>Fc gamma receptor</i>
fMLP	do inglês <i>N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine</i>
GCs	guanilato ciclase solúvel
GSF	fator estimulador de colônia, do inglês <i>colony-stimulating factor</i>
GM-GSF	fator estimulador de colônia de Granulócitos e Macrófagos, do inglês <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GMPc	guanilato monofosfato cíclico
IDP	Imunodeficiências Primárias
IFN-γ	interferon gama
IκB	do inglês <i>inhibitor of kappa B</i>
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-12Rβ2	receptor β2 de Interleucina 12
IRAKs	do inglês <i>IL-1 Receptor-associated Kinases IFN-γ</i>
IRF3	fator regulador de interferon 3, do inglês <i>interferon regulator factor 3</i>
JNK	do inglês <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LBP	proteína ligadora de LPS, do inglês <i>LPS biding protein</i>
L-NMMA	do inglês <i>NG-monomethyl-L-arginine</i>
LPS	lipopolissacarídeo
LTB ₄	leucotrieno B ₄
MØ	macrófago

M-CSF	fator estimulador de colônia de macrófagos, do inglês <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC	complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
MPO	mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>messenger RNA</i>
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
NOS	enzima sintetizadora de óxido nítrico, do inglês <i>nitric oxide synthase</i>
ODQ	inibidor de guanilato ciclase solúvel
PAF	fator ativador de plaquetas, do inglês <i>platelet activating factor</i>
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular pathern</i>
PBM	monócitos de sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood monocytes</i>
PBMC	células mononucleares de sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PKA	proteína quinase A, do inglês <i>protein kinase A</i>
PKC	proteína quinase C, do inglês <i>protein kinase C</i>
PKG	proteína quinase G, do inglês <i>protein kinase G</i>
PLA ₂	fosfolipase A2
PLC	fosfolipase C
PMA	acetato de forbol miristato, do inglês <i>phorbol-myristate-acetate</i>
RNA	ácido ribonucléico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SOD	superóxido dismutase
TLR	do inglês <i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>

LISTA DE FÓRMULAS

H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HOCl	ácido hipocloroso
NO	óxido nítrico
NO_3^-	nitrito
$\text{O}_2^{\cdot-}$	ânion superóxido
OH^{\cdot}	radical hidroxila
ONOO^-	peroxinitrito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Fagócitos Mononucleares	24
1.2 Reconhecimento e Fagocitose	25
1.3 Respostas de Monócitos/Macrófagos	27
1.4 Regulação da Resposta de Monócitos/Macrófagos - NF-κB	30
1.5 Falhas nas Respostas de Monócitos - Imunodeficiências Primárias	32
1.6 Alternativa para Aumento da Resposta de Monócitos - Guanilato Ciclase Solúvel e BAY 41-2272	34
CAPÍTULO 1 - BAY 41-2272 ATIVA FAGÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS	37
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
<i>2.2.1 Avaliar em células THP-1 e PBM, tratadas com BAY 41-2272 ou IFN-γ</i>	39
<i>2.2.2 Avaliar os efeitos do BAY 41-2272 sobre a via do NF-κB</i>	39
<i>2.2.2 Avaliar o potencial do BAY 41-2272 em restaurar a resposta imune, tratando PBM de pacientes com DGC ou deficiência de MPO</i>	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Algoritmos da Metodologia – Células Humanas	41
3.2 Células de Linhagem e Monócitos Humanos	41
<i>3.2.1 Linhagens THP-1 e U937</i>	41
<i>3.2.2 Casuística</i>	42
<i>3.2.3 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)</i>	43
<i>3.2.4 Isolamento de Monócitos a partir das PBMC</i>	44
3.3 Cultura Celular e Estimulação das Células	44
<i>3.3.1 Cultura Celular</i>	44
<i>3.3.2 Tratamentos Farmacológicos e outros Estímulos</i>	45
3.4 Caracterização Imunofenotípica das Células	47
3.5 Produção de Citocinas	48
3.6 Avaliação do Sistema NADPH oxidase	49
<i>3.6.1 Expressão Gênica de CYBA, CYBB, NCF1 e NCF2</i>	49

3.6.2 Avaliação da Expressão Protéica de p22 ^{PHOX} , p47 ^{PHOX} , p67 ^{PHOX} por Western blot.....	51
3.6.3 Liberação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	52
3.7 Avaliação da via do NF-κB	53
3.7.1 Degradação do IκBα e Fosforilação do NF-κB (p65)	53
3.7.2 Avaliação de Células Knockdown para NF-κB.....	54
3.8 Avaliação da resposta a patógenos	55
3.8.1 Fagocitose de Zymosan, <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i>	55
3.8.2 Atividade Microbicida contra <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i>	55
3.9 Análise estatística	56
4 RESULTADOS.....	58
4.1 Pré-tratamento com BAY 41-2272 Altera o Perfil Imunofenotípico de Células THP-1 e Monócitos de Sangue (PBM).....	59
4.2 Pré-tratamento com BAY 41-2272 Induz um Perfil Pró-inflamatório nas Células THP-1 e Monócitos de Sangue (PBM).....	61
4.3 Ativação do Sistema NADPH Oxidase pelo Tratamento com BAY 41-2272	63
4.3.1 Indução da Expressão Gênica de CYBA e NCF2 pelo BAY 41-2272.....	65
4.3.2 Aumento da Expressão Protéica de p67 ^{PHOX} e gp91 ^{PHOX}	66
4.4 Ativação da via do NF-κB pelo Tratamento com BAY 41-2272	69
4.4.1 Pré-tratamento com BAY 41-2272 Promove a Degradação de IκBα e Fosforilação de NF-κB de Forma Dependente de PKG.....	69
4.4.2 Pré-tratamento com BAY 41-2272 Induz a Ativação do Sistema NADPH Oxidase de Forma Dependente de NF-κB	74
4.5 BAY 41-2272 Acentua a Resposta Microbicida de Monócitos de Pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC) e Deficiência de Mieloperoxidase (MPO).....	76
4.6 Sumário dos Resultados	85
CAPÍTULO 2 - EFEITO IN VIVO DO TRATAMENTO COM BAY 41-2272.....	86
5 OBJETIVOS.....	87
5.1 Objetivo Geral.....	88
5.2 Objetivos Específicos	88
5.2.1 Avaliar Camundongos C3H/HePas, Tratados Intraperitonealmente (i.p.) com BAY 41-2272 ou Concanavalina A.....	88

5.2.2 Avaliar Macrófagos Peritoneais de Camundongos C3H/HePas, Tratados i.p. com BAY 41-2272 ou Concanavalina A	88
6 MATERIAIS E MÉTODOS	89
6.1 Algoritmo da Metodologia – Modelo Animal	90
6.2 Animais	90
6.3 Tratamentos Farmacológicos	91
6.4 Avaliação da Indução de Migração Celular – Obtenção de Células do Peritônio, Baço, Linfonodo Mesentérico e Medula Óssea	92
6.5 Avaliação do Efeito sob Inflamação em Modelos de Edema de Pata Induzido por Carragenina.....	93
6.6 Função dos Macrófagos Peritoneais - Espriamento.....	93
6.7 Função dos Macrófagos Peritoneais - Fagocitose	94
6.8 Avaliação ex vivo da Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)	95
6.9 Avaliação ex vivo da Produção de Óxido Nítrico pela Dosagem de Nitritos (NO₂⁻)	95
6.10 Avaliação da Resposta dos Animais Frente à Infecção com <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	96
6.11 Avaliação da Atividade Microbicida de Macrófagos Peritoneais Tratados ex vivo e in vitro – Modelos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	97
6.12 Análise estatística	98
7 RESULTADOS.....	99
7.1 Tratamento com BAY 41-2272 induz o Influxo Macrófagos para o Peritônio, mas não o Recrutamento Celular para os Órgãos Linfóides.....	100
7.2 Pré-tratamento intraperitoneal (i.p.) com BAY 41-2272 Aumenta a Inflamação na Pata Induzida por Carragenina	103
7.3 BAY 41-2272 Aumenta o Espriamento e Atividade Fagocítica ex vivo de Macrófagos Peritoneais.....	103
7.4 Produção de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio pós Tratamento com BAY 41-2272.....	104
7.5 Avaliação da Resposta de Camundongos C3H/HePas Tratados com BAY 41-2272 e Desafios com <i>C. albicans</i> ou <i>S. aureus</i>	105
7.6 Avaliação da Atividade Microbicida de Macrófagos Peritoneais Tratados ex vivo ou in vitro com BAY 41-2272.....	107
7.7 Sumário dos Resultados	109

8 DISCUSSÃO	110
9 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS	126
APÊNDICES	139
APÊNDICE A - Degradação de I κ B α em células U937 selvagens e com vetor contendo I κ B α mutado	140
APÊNDICE B - Expressão de TLR4 em células U937 <i>knockdown</i> para NF- κ B	141
APÊNDICE C - Função da Guanilato Ciclase Solúvel em monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO	142
APÊNDICE D - Ativação de NF- κ B, dependente de PKG, em monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO	143
APÊNDICE E - Expressão de TLR2 e CD163 em monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO	144
APÊNDICE F - Soeiro-Pereira PV, Falcai A, Kubo CA, Oliveira-Júnior EB, Marques OC, Antunes E, Condino-Neto A. BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase agonist, activates human mononuclear phagocytes. Br J Pharmacol. 2012 Jul;166(5):1617-30.	145



1 INTRODUÇÃO

1.1 Fagócitos Mononucleares

O sistema imunológico humano tem sido dividido tradicionalmente em imunidade inata e adquirida (adaptativa). Os monócitos possuem um papel importante nesses dois braços da resposta imune. São células presentes no sangue, constituindo 3 a 8 % dos leucócitos circulantes. Derivadas da medula óssea, são liberadas num estado imaturo e indiferenciado, completando sua maturação nos tecidos e órgãos para os quais migram (Auffray et al., 2009). Com esse processo de diferenciação, os monócitos originam, entre outras células, os macrófagos. Estas células apresentam três funções principais: a fagocitose; a imunomodulação; e a apresentação de antígenos (Geissmann et al., 2010).

Em geral, os fagócitos mononucleares ingerem partículas por dois motivos: eliminação de restos celulares, células apoptóticas e fragmentos estranhos ao organismo; e em resposta a microrganismos invasivos, erradicando-os. Os monócitos e macrófagos possuem diferentes enzimas hidrolíticas em seus lisossomos, que contribuem para a degradação dos patógenos. Além dessas enzimas, há liberação de reativos intermediários do oxigênio, como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Appelberg, 2006; Serbina et al., 2008), fundamentais para adequada resposta microbicida.

Monócitos e macrófagos ativados possuem importante papel modulador sobre a resposta imune, secretando uma variedade de citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IL-10, TGF- β , IFN- α e - β , GM-CSF, M-CSF), fatores angiogênicos (VEGF), quimiocinas (IL-8, IP-10, ENA-78), fatores coagulantes, eicosanóides, componentes do complemento e várias enzimas, como as proteases (Faas et al., 2004; Haider et al., 2004; Rossol et al., 2011). A secreção destes fatores depende do tipo de estímulo e da localização que o macrófago se encontra (Tacke, Randolph, 2006). A produção de citocinas como a IL-12, que estimula linfócitos T, ilustra a participação dos fagócitos mononucleares na regulação da imunidade adaptativa. Ainda, há outro papel dessas células que os caracterizam participando dos dois braços da resposta imune, o de “apresentador” de antígenos (Sung, 2008). Os patógenos fagocitados são processados no fagolisossomo ao mesmo tempo em que são sintetizadas moléculas do MHC (do inglês *major histocompatibility complex*) de classe II. Estas se combinarão com à fragmentos dos microrganismos degradados para apresentação destes ao linfócito T, que reconhece este complexo MHC/antígeno

pelo seu complexo TCR (do inglês *T cell receptor*). Esta ligação estimula vias de sinalização importantes para a produção de citocinas, expressão de moléculas de adesão e receptores de superfície, e vários outros sinais que modularão o sistema imune, inclusive outros fagócitos, como os neutrófilos (Unanue, Allen, 1986; Mellman et al., 1998). Esta é apenas uma das formas de interação dos fagócitos mononucleares com outros tipos celulares, que levam ao aumento da eficiência e complexidade da resposta.

1.2 Reconhecimento e Fagocitose

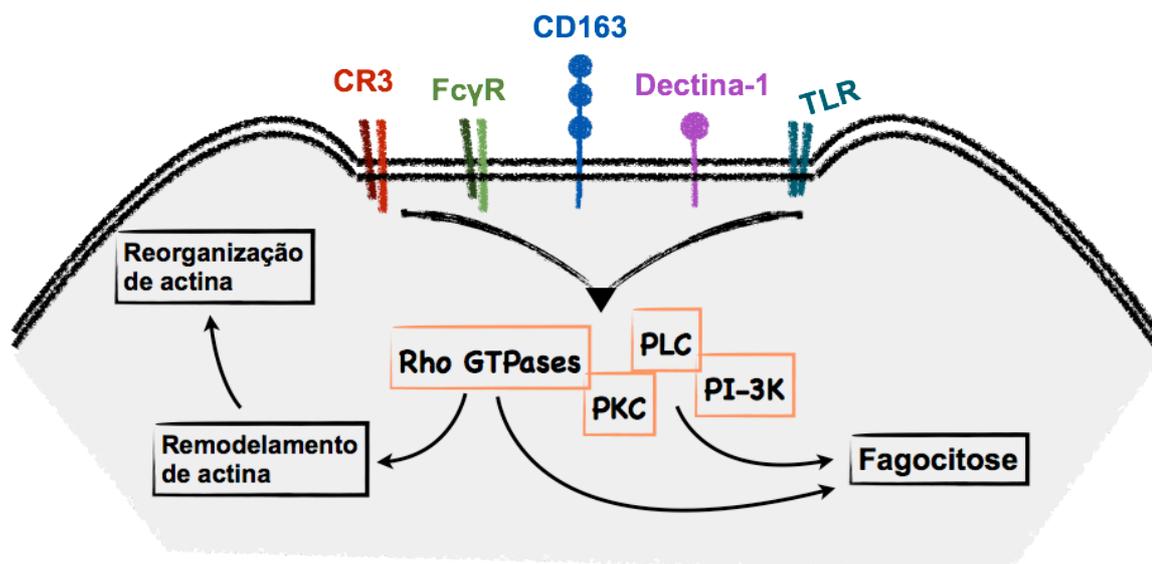
Como citado anteriormente, os monócitos e macrófagos reconhecem e ingerem partículas e microrganismos. Isto é possível, pois essas células expressam um amplo número de proteínas de superfície com vias cruciais para suas funções biológicas (**Figura 1**). Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern-recognition receptors*) microbianos são componentes essenciais da imunidade inata, na qual eles identificam padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), resultando na ativação dos fagócitos mononucleares, como parte da resposta para erradicar os microrganismos invasores (Gordon, 2002).

Uma classe importante de PRRs é constituída pela família dos receptores semelhantes ao *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*), que reconhecem uma vasta gama de patógenos e produtos relacionados a estes. TLR são expressos em um nível muito mais elevado nos monócitos que nos neutrófilos (Medzhitov, Janeway, 2000a). Mediante ligação com agonistas específicos, os TLRs sinalizam via proteína adaptadora MyD88, ou de forma independente desta, envolvendo TRIF (do inglês *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), para ativar NF- κ B (do inglês *nuclear factor kappa B*) (Akira, Takeda, 2003; Medzhitov, Janeway, 2000b). Este fator de transcrição é muito importante em diversas funções dos fagócitos, como a produção de citocinas pró-inflamatórias.

De uma forma geral, o TLR2 reconhece lipopeptídeos e peptidoglicanos, TLR3 reconhece RNA de fita dupla, TLR4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS), TLR5 reconhece flagelina bacteriana, enquanto TLR9 reconhece porção CpG não metilada de DNA bacteriano. A capacidade de reconhecimento dos TLR pode ser expandida pela formação de heterodímeros como TLR2/TLR6, importantes na identificação e

reposta a *C. albicans*. Outros receptores podem cooperar com TLR específicos para potencializar o reconhecimento de patógenos. Um exemplo dessa colaboração é o CD14, que se liga ao lipopolissacarídeo (LPS) e interage com o TLR4 para facilitar a identificação e erradicação de bactérias gram-negativas (Takeda et al., 2003; Turvey, Hawn, 2006).

Figura 1 - Receptores importantes para fagocitose



Representação das principais vias envolvidas no reconhecimento de patógenos e indução de fagocitose. CR: receptor de complemento; FcγR: receptor de porção Fc de IgG; TLR: *Toll like receptor*; PKC: *protein kinase C*; PLC: *phospholipase C*; PI-3K: *phosphatidylinositol 3 kinase*.

Receptores *scavengers*, envolvidos na “limpeza” do organismo, também são importantes para as funções dos fagócitos. Esses receptores promovem o reconhecimento e captação de macromoléculas de carga negativa, como lipoproteínas oxidadas (Podrez et al., 2000; Rice et al., 2002). O CD163 é um exemplo desses receptores. Esta molécula é expressa exclusivamente em monócitos/macrófagos, funcionando como receptor que medeia a endocitose de complexos de hemoglobina-haptoglobina (Schaer et al., 2007). Diferente de suas funções homeostáticas, foi caracterizado que o CD163, quando ligado por anticorpos monoclonais específicos, induz a produção de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , sugerindo um papel na defesa do organismo. Esta ação foi comprovada por Fabriek et al. (2009) e Kneidl et al. (2012), que mostraram a importância desse receptor em resposta a bactérias gram-positivas e -negativas.

O reconhecimento de microrganismos pelos fagócitos mononucleares também pode ser feito indiretamente, por um processo chamado opsonização. Imunoglobulinas, principalmente IgG, ou componentes do sistema complemento ligam-se à patógenos para facilitar a sua identificação e ingestão. Esse processo depende de receptores para porção Fc de imunoglobulinas ou de receptores do complemento (Fernández et al., 2003). O receptor de complemento 3 (CR3, do inglês *complement receptor 3*) é considerado um dos mais importantes para a fagocitose. Esse receptor, CR3, também é conhecido como MAC-1 (do inglês, *macrophage antigen 1*), sendo formado pela subunidade α (CD11b) e subunidade β (CD18). O CR3 reconhece tanto moléculas endógenas quanto exógenas, como iC3b do sistema complemento, ICAM-1 (do inglês, *intercellular adhesion moleule 1*), β -glucanas e outros açúcares da parede de microrganismos (Ross, Větvicka, 1993; Zhou et al., 1992).

O processo que envolve o reconhecimento de patógenos ou de seus componentes leva a indução de vias de sinalização específicas. Estes sinais ativam os mecanismos responsáveis pela eliminação dos patógenos e regulação da resposta imune.

1.3 Respostas de Monócitos/Macrófagos

Dentre os principais mecanismos efetores da resposta de monócitos/macrófagos, podemos citar a liberação de enzimas lisossomais, a acidificação do pH (3 – 5,4) dos fagossomos, a produção de reativos de nitrogênio, a síntese de peptídeos microbicidas (defensinas e proteínas catiônicas), produção de competidores (lactoferrina) e a síntese de reativos derivados do oxigênio (Djaldetti et al., 2002; Flannagan et al., 2009).

Os reativos derivados de oxigênio são produzidos a partir de um sistema protéico, chamado NADPH (do inglês, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase. Este complexo é constituído por seis componentes principais: p47^{PHOX}, p67^{PHOX} e p40^{PHOX}, proteínas citosólicas; rac1 (nos monócitos) ou rac2 (nos neutrófilos), também citosólicas e do tipo ras; p22^{PHOX} e gp91^{PHOX} que compõem o flavocitocromo b_{558} na membrana dos fagócitos (El-Benna et al., 2005). A NADPH oxidase pode ser ativada tanto via receptores quanto por mecanismos independentes destes (Bokoch, 1995). Dentre os fatores que induzem a ativação

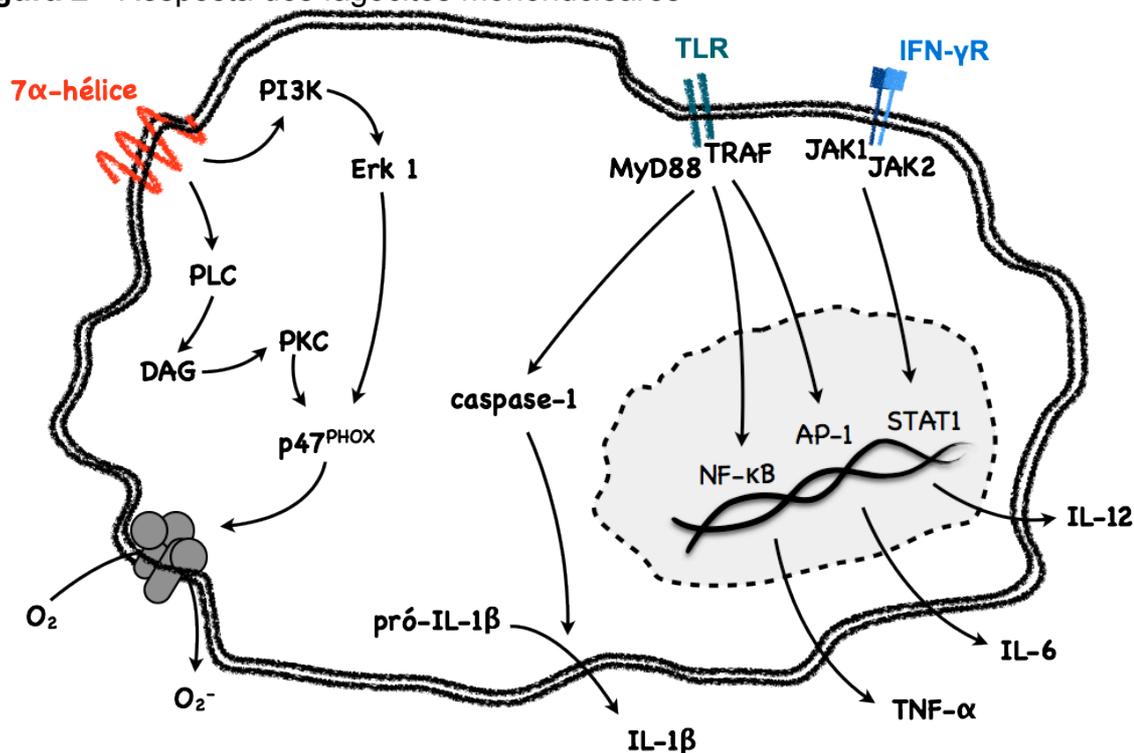
deste sistema podemos citar opsoninas (iC3b do complemento e anticorpos IgG), fragmentos do complemento, agonistas de TLR (LPS, peptidoglicanos), entre outros (DeLeo et al., 1998; Thiele et al., 2004).

Após receber esses estímulos, ocorre a fosforilação, ativação e associação dos componentes do sistema NADPH oxidase na membrana da célula e na membrana do fagolisossomo. O primeiro componente a ser fosforilado é a p47^{PHOX}, fazendo com que ele próprio e os demais componentes migrem para a membrana e se associem ao citocromo *b*₅₅₈. Ao mesmo tempo a rac-GDP incorpora um ATP, tornando-se rac-GTP, migrando também para a membrana. Este é então acionado pela p67^{PHOX} e rac, iniciando o funcionamento do sistema (Dang et al., 2001). Uma vez ativado, a NADPH oxidase inicia a explosão respiratória, produzindo o ânion superóxido (O₂⁻), o qual é convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima superóxido dismutase (SOD), que por sua vez é convertido em ácido hipocloroso (HOCl) e radical hidroxila (OH•) pela enzima mieloperoxidase (MPO) (Burg, Pillinger, 2001). Todos esses reativos estão envolvidos com a adequada morte de patógenos, sejam estas bactérias ou fungos.

Como citado anteriormente, os monócitos/macrófagos estão envolvidos com a resposta à patógenos de forma direta - fagocitose e produção de reativos microbicidas - ou pela ação de seus produtos sobre outras células do sistema imunológico (**Figura 2**). Esse papel imunomodulador é bem caracterizado pela produção de citocinas, como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (Mahbub-E-Sobhani et al., 2001). Estas tem importante papel na ativação de outras células e na manutenção da resposta inflamatória.

A IL-1β, juntamente com o TNF-α, é definida como uma citocina alarme (Carter, 2005; Flad et al., 1999). Essa é uma citocina pró-inflamatória, que induz a expressão de genes como os que codificam iNOS (do inglês *inducible nitric oxide synthase*) e outras citocinas e quimiocinas. Além disso, a IL-1β aumenta a expressão de moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1) no endotélio, que promovem a infiltração de leucócitos do sangue para os tecidos. Essa citocina é sintetizada, inicialmente, como uma molécula precursora não ativa (pró-IL-1β), necessitando de sinalização específica para ser liberada. Nesse contexto, a caspase 1 tem o papel de clivar a pró-IL-1β, produzindo a forma madura IL-1β, secretada no meio extracelular (Eder, 2009).

Figura 2 - Resposta dos fagócitos mononucleares



Ao reconhecerem os estímulos - quimiocinas, PAMPs, IFN- γ , os receptores geram uma sinalização intracelular que ativam o sistema NADPH oxidase e a produção de citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12.

Um dos genes ativados pela IL-1 β é o que codifica a IL-6. Esta citocina foi originalmente descrita como um fator estimulador de linfócitos B, mas outras funções vem sendo atribuídas a ela. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, envolvida na comunicação do sistema imunológico/hematopoiético com células estromais, incluindo o início e resolução da inflamação, repostas às infecções, e remodelamento tecidual (Gabay, 2006; Rose-John et al., 2007). Juntamente com IL-1 β e IL-6, o TNF- α é uma importante citocina da resposta de monócitos/macrófagos. O TNF- α age nas células endoteliais vasculares, promovendo vasodilatação, e secreção de quimiocinas. No hipotálamo ele age como pirógeno endógeno induzindo febre, enquanto que no fígado vai estimular a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e de fibrinogênio (Burger, Dayer, 2002; Mühl, Pfeilschifter, 2003). Podemos considerar que, essencialmente, seu principal efeito fisiológico é promover a resposta imune e a inflamação.

Também produzida por monócitos/macrófagos, a IL-12 tem como função principal a indução da produção de IFN- γ por células NK (do inglês *natural killers*) e linfócitos T, aumentando a citotoxicidade de células NK e linfócitos T citotóxicos, e

promovendo a diferenciação de linfócitos T *naïve* em células Th1 (do inglês *T helper 1*). Esses efeitos mostram o papel central da IL-12 na imunidade mediada por células, evidenciando a ação dos monócitos/macrófagos na modulação de respostas complexas do sistema imune, dependente de diferentes vias de sinalização (Gee et al., 2009; Lee et al., 1998).

1.4 Regulação da Resposta de Monócitos/Macrófagos - NF- κ B

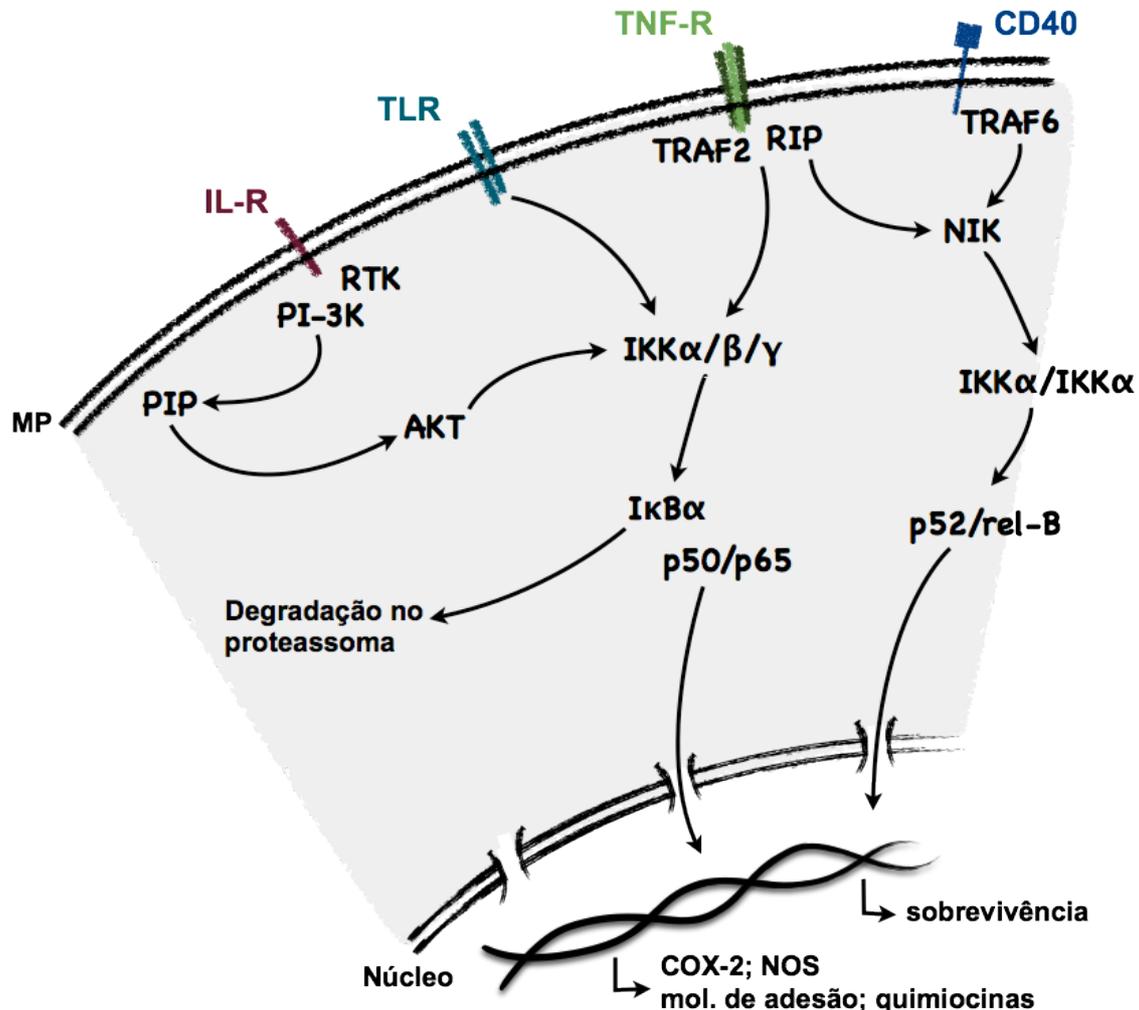
Conforme ressaltado anteriormente, não só a ativação do sistema NADPH oxidase e outros mecanismos efetores, mas também a produção e secreção de citocinas, dependem de diferentes vias de sinalização. No caso dos monócitos/macrófagos proteínas como TRAF (do inglês *TNF receptor associated factor*), MAPk (do inglês *mitogen-associated protein kinase*) e JAK (do inglês *Janus kinase*) são essenciais para a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 (do inglês *activator protein 1*) (Jin et al., 2012; Majumdar, Aggarwal, 2003). Ainda, em células mielóides a expressão gênica é devida, em parte, à combinação de múltiplos fatores de transcrição. Por exemplo, o PU.1 e Sp1 ativam os promotores dos genes codificadores de CD11b e CD18 (Chen et al., 1993; Heydemann et al., 1996; Rosmarin et al., 1998), e o mesmo PU.1 coopera com C/EBP β na ativação do promotor de IL-1 β (Yang et al., 2000).

Esses exemplos mostram o quão complexo é o controle transcricional nos monócito/macrófagos. No entanto, existem alguns fatores com maior participação chave para regular os mecanismos efetores dessas células. Um desses fatores é o NF- κ B. Como citado anteriormente, a ativação desse fator leva à produção de mediadores inflamatórios com papel essencial na resposta do organismo contra patógenos (Naumann, 2000). A família do NF- κ B (ou família Rel) consiste de cinco subunidades que incluem: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 e p52. Esta família é caracterizada por compartilhar um domínio amino-terminal RHD (do inglês *Rel homology domain*) (Meffert, Baltimore, 2005).

As subunidades do NF- κ B formam homo ou heterodímeros ativadores (p50-p65) ou repressores (p50-p50 e p52-p52). Estes se encontram no citoplasma da maioria das células, complexados com as proteínas inibitórias da família kappa B (I κ B, do inglês *Inhibitory kappa B*) - I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B-R, I κ B γ (p105), I κ B δ (p100) e Bcl-3. O heterodímero p50-p65 é comumente utilizado como sinônimo de NF- κ B

por ser o mais abundante da família e, em sua maioria, está associado ao I κ B α (Malek et al., 2007).

Figura 3 - Vias de ativação do NF- κ B



Principais vias de ativação do fator de transcrição NF- κ B. Primeiramente, há fosforilação do inibidor I κ B α , liberando o NF- κ B. Assim, este fator é fosforilado e ativado, translocando-se para o núcleo, onde exerce sua função.

Existem duas vias principais para a ativação do NF- κ B, a clássica (via canônica) e a alternativa (via não-canônica). A via clássica é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata e à sobrevivência celular (Xiao, 2004) (**Figura 3**). Na via clássica, para que haja ativação do NF- κ B, o I κ B é fosforilado nas serinas 32 e 36 pelo complexo de proteína quinase IKK. Essa fosforilação é o sinal para a ubiquitinação e posterior degradação do I κ B pelo proteossoma. No citoplasma um conjunto de proteínas adaptadoras (TRAFs, MyD88 e TIRAP) e quinases (RIP, IRAK) formam um

complexo quando há um estímulo, facilitando o recrutamento da IKK. Após a degradação do I κ B os dímeros do NF- κ B (p.ex. p50-p65) são liberados e migram para o núcleo onde atuarão na regulação da transcrição de genes específicos (Kaltschmidt et al., 2005). Dentre estes podemos citar os genes codificantes de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, TNF- α), receptores de superfície (CD80, CD40, CD134, TLR2, TNFR), proteínas de fase aguda (proteína C reativa, LBP), entre outras (COX-2, SOD, TRAF, IRF, PU.1) (Bonadies et al., 2010; Kang et al., 2007; Son et al., 2008; Wang et al., 1998).

De uma forma geral, a resposta contra patógenos depende da ativação e funcionamento adequados dos sistemas efetores (fagocitose, sistema NADPH oxidase), das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e da regulação da resposta (vias de sinalização e fatores de transcrição, como NF- κ B). Defeitos em qualquer um desses mecanismos acarretarão, em sua maioria, na susceptibilidade à infecções por diferentes patógenos, quadros caracterizados como Imunodeficiências Primárias (IDP).

1.5 Falhas nas Repostas de Monócitos - Imunodeficiências Primárias

Os progressos no esclarecimento das bases genéticas e moleculares envolvendo imunodeficiências congênitas tem definido fatores críticos para regulação das respostas imunes inatas mediadas por monócitos/macrófagos (). Mutações funcionais no eixo IL-12 / IL23 /IFN- γ são associadas a infecções por micobactérias devido à falha dos fagócitos mononucleares em matar esses microrganismos após a fagocitose (Pedraza-Sánchez et al., 2010; Qu et al., 2011). Também são descritas susceptibilidades a micobactérias atribuídas a mutações no NEMO (do inglês *NF- κ B essential modulator*), uma subunidade da quinase de IKK (do inglês *I κ B α kinase*), que regula a via do NF- κ B (Filipe-Santos et al., 2006). Estudos recentes (Cabral-Marques et al., 2012) mostram a importância da sinalização CD40-CD40L (CD154) para o adequado desenvolvimento dos fagócitos e sua resposta, principalmente a fungos.

Todos esses estudos nos mostram a variedade de mecanismos reguladores que, se afetados, podem abolir a resposta de monócitos/macrófagos contra patógenos. Outro quadro severo é estabelecido quando essas falhas ocorrem diretamente em componentes dos mecanismos efetores desses fagócitos. Nesse

contexto, podemos citar a Doença Granulomatosa Crônica (DGC), na qual mutações em qualquer um dos componentes do sistema NADPH oxidase levam à falha na produção do ânion superóxido e, conseqüentemente, dos seus derivados (Jurkowska et al, 2004). As mutações podem apresentar um padrão de herança ligada ao X (60-80 %, falhas na gp91^{PHOX}) ou autossômicas (20-40 %, falhas nos demais componentes da NADPH oxidase) (de Oliveira-Júnior et al., 2011). Clinicamente, os pacientes com DGC manifestam de pneumonia, dermatite infecciosa e formação recorrente de abscessos em órgãos como fígado e pulmão. Uma parte significativa das infecções observadas em pacientes com DGC são causadas por *Staphylococcus aureus*, mas também são observadas infecções por *Aspergillus*, *Candida* e *Streptococcus* (Agudelo-Flórez et al., 2006). Mutações extrínsecas aos componentes da NADPH oxidase podem afetar esse sistema, como as relacionadas à via do CD40-CD40L (Cabral-Marques et al., 2012).

Mesmo com o sistema NADPH oxidase funcional outras moléculas são importantes para a formação de todos os reativos de oxigênio, como a mieloperoxidase. A MPO é uma enzima lisossômica presente nos grânulos de monócitos/macrófagos. A sua função é catalizar a reação entre o H₂O₂ e os íons haleto, geralmente Cl⁻, para produção de ácido hipocloroso (HOCl) (Lincoln et al., 1995). Mutações no gene *MPO*, apresentando padrão autossômico recessivo, levam a deficiência dessa enzima (Marchetti et al., 2004; Nauseef et al., 1996). A maioria dos pacientes apresenta sintomas brandos, como um aumento discreto na frequência de quadros infecciosos. Para organismos como *S. aureus*, o *killing* é inicialmente comprometido, mas alcança níveis normais com o decorrer da infecção. No entanto, a capacidade de matar certos fungos parece estar completamente afetada, como *C. albicans* (Maródi et al., 1998).

No âmbito do diagnóstico e aconselhamento genético houve, nos últimos anos, um avanço grande para as IDPs. No entanto, a maior parte dos tratamentos ainda visa o uso de antibióticos profiláticos e abrandamento dos sintomas decorrentes das infecções. São raros os tratamentos visando o restabelecimento das falhas que levam à essas doenças, sendo o transplante de medula óssea o mais frequente e eficaz. No caso da DGC, sabemos que o tratamento com IFN- γ melhora o quadro clínico, diminuindo a frequência e gravidade das infecções (Condino-Neto et al., 2000; Errante et al., 2008). O mecanismo de ação do IFN- γ nesses pacientes, inicialmente atribuído a regulação positiva do sistema NADPH oxidase e da enzima

iNOS, não foi confirmado (Condino-Neto et al., 1996). Mesmo sem ter um mecanismo definido, essa terapia abriu as possibilidades para o estudo de alternativas no tratamento de IDPs.

1.6 Alternativa para aumento da Resposta de Monócitos - Guanilato Ciclase Solúvel e BAY 41-2272

Com as “portas abertas” pelo resultado positivo do uso de IFN- γ em pacientes com DGC, nosso grupo tem se dedicado, entre outros estudos, a avaliar a possibilidade de ativar ou recuperar farmacologicamente a atividade das células do sistema imunológico. Apesar da ação do IFN- γ sobre a indução iNOS não ter sido comprovada em um primeiro momento (Condino-Neto et al., 1996), existem muitos indícios de que essa via é importante para os fagócitos mononucleares humanos (Nicholson et al., 1996; Rockett et al., 1998). No entanto, mudamos o foco da pesquisa não para um efeito compensatório da falta de reativos de oxigênio pela ativação de outras vias envolvidas com a sinalização do óxido nítrico (NO). Por exemplo, é descrito que o NO, dependendo de sua concentração, regula a atividade de NF-kB do tipo celular e de co-estímulos (Hickey et al, 1997). Ainda, está bem definida a interação de NO com a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (Derbyshire, Marletta, 2012; Martin et al., 2012; Wang et al., 2012).

A GCs é um heterodímero composto de subunidades α e γ (Hobbs, 1997), e encontra-se expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos. Essa enzima medeia várias funções fisiológicas importantes, tais como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Hobbs, 1997; Kuhn, 2003). A GCs apresenta um grupo prostético heme necessário para sua ativação pelo NO (Gerzer et al., 1982; Ignarro et al., 1982; Ohlstein et al., 1982). Esta ativação causa uma elevação nos níveis de GMPc (do inglês *guanosine monophosphate*), o qual é clivado a partir do GTP (do inglês *guanosine triphosphate*) pela GCs (Rapoport et al., 1983).

Em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM \emptyset) de ratos incubados com o ativador de GCs, BAY 41-2272 (5-Ciclopropil-2-{1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridina-3-il}-pirimidina-4-ilamina), verificou-se um aumento significativo na expressão de iNOS, demonstrando um efeito dose-dependente do BAY 41-2272

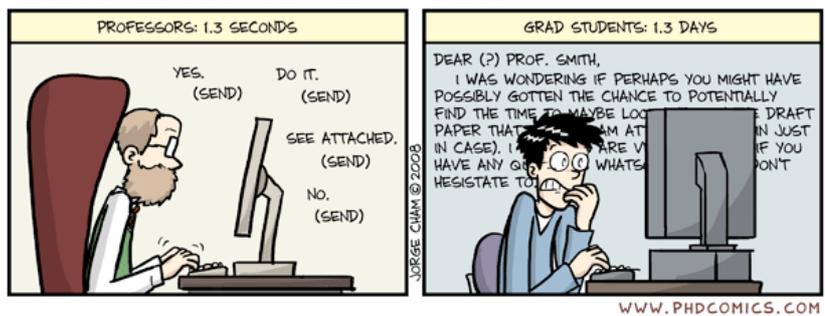
O BAY 41-2272, uma molécula derivada do YC-1 (3-[(5'-hidroximetil-2'fúril)-1-benzil indazol]), foi descrito como um ativador direto de GCs devido ao seu acoplamento a um sítio regulatório independente do NO (Liu, Wu, 2005). Não se trata de uma droga doadora de NO, mas sim de um composto que se liga a GCs num sítio alostérico da enzima, na subunidade $\alpha 1$, a qual contém as Cys238 e Cys243 (Becker et al., 2001). Esta região modula a atividade catalítica e a responsividade do ligante acoplado ao grupamento heme (Martin et al., 2001) (**Figura 4 B**). Por essas características, esse fármaco mostrou ser uma ferramenta farmacológica apropriada para o estabelecimento de um estudo da via da GCs/GMPc em monócitos/macrófagos humanos.

Nos primeiros estudos do nosso grupo, envolvendo células pró-monocíticas humanas THP-1 cultivadas, verificou-se que o fármaco eleva os níveis de GMPc, confirmando a presença da via ativa de GCs em monócitos humanos. Mais importante, o BAY 41-2272 estimulou a produção de ânion superóxido e aumentou a expressão da gp91^{PHOX} (Borges de Oliveira-Junior et al., 2007). Recentemente, demonstramos essas ações do fármaco também em monócitos de sangue humanos. O BAY 41-2272 induziu a produção de reativos de oxigênio, aumentou a fagocitose e, de forma mais significativa, a atividade microbicida (Soeiro-Pereira et al., 2012) (**Figura 4 C**).

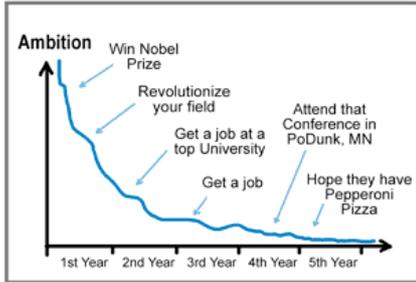
O potencial do BAY 41-2272, e da via da GCs/GMPc, na resposta a patógenos traz uma nova perspectiva para o desenvolvimento de opções no tratamento de imunodeficiências primárias, como a Doença Granulomatosa Crônica e a deficiência de MPO. Com este estudo aumentamos os conhecimentos a respeito da sinalização e diferenciação dos monócitos, mostrando a relevância da via da GCs no estabelecimento e regulação da sua resposta. À partir desse estudo, poderemos com maior confiança sugerir alternativas acessíveis para a ativação das células do sistema imunológico e tratamento de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos.

CAPÍTULO 1 - BAY 41-2272 ATIVA FAGÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS

AVERAGE TIME SPENT COMPOSING ONE E-MAIL



YOUR LIFE AMBITION - What Happened??



JORGE CHAN © 2008

WWW.PHDCOMICS.COM

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial do agonista de guanilato ciclato solúvel, BAY 41-2272, como alternativa para o tratamento de infecções em pacientes imunodeficientes, pela sua ação na diferenciação e ativação de monócitos humanos.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar em células THP-1 e PBM, Tratadas com BAY 41-2272 ou IFN- γ

- a) alterações fenotípicas importantes para resposta de fagócitos mononucleares (expressão de CD11b, CD18, CD14, TLR4, TLR2, CD163, gp91^{PHOX});
- b) produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70);
- c) ativação do sistema NADPH oxidase – expressão gênica de *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e expressão protéica p22^{PHOX}, p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, gp91^{PHOX}.

2.2.2 Avaliar os Efeitos do BAY 41-2272 sobre a via do NF- κ B, por meio do

- a) tratamento de células THP-1 e PBM e medida da degradação do I κ B α ;
- b) tratamento de células THP-1 e PBM e medida da fosforilação NF- κ B (p65);
- c) tratamento de células U937 *knockdown* para NF- κ B e análise da indução do sistema NADPH oxidase – produção de O₂⁻ e expressão gênica de *CYBB* e *NCF2*.

2.2.2 Avaliar o Potencial do BAY 41-2272 em Restaurar a Resposta Imune, tratando PBM de Pacientes com DGC ou Deficiência de MPO para Avaliar

- a) a atividade fagocítica – Zymosan, *S. aureus* e *C. albicans*;
- b) a produção de espécies reativas de oxigênio – O₂⁻ e H₂O₂;
- c) a atividade microbicida a *S. aureus* e *C. albicans*.

What your research supposedly looks like:

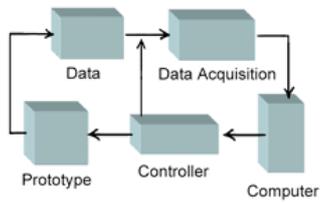


Figure 1. Experimental Diagram

What your research *actually* looks like:

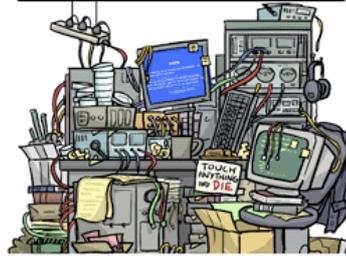


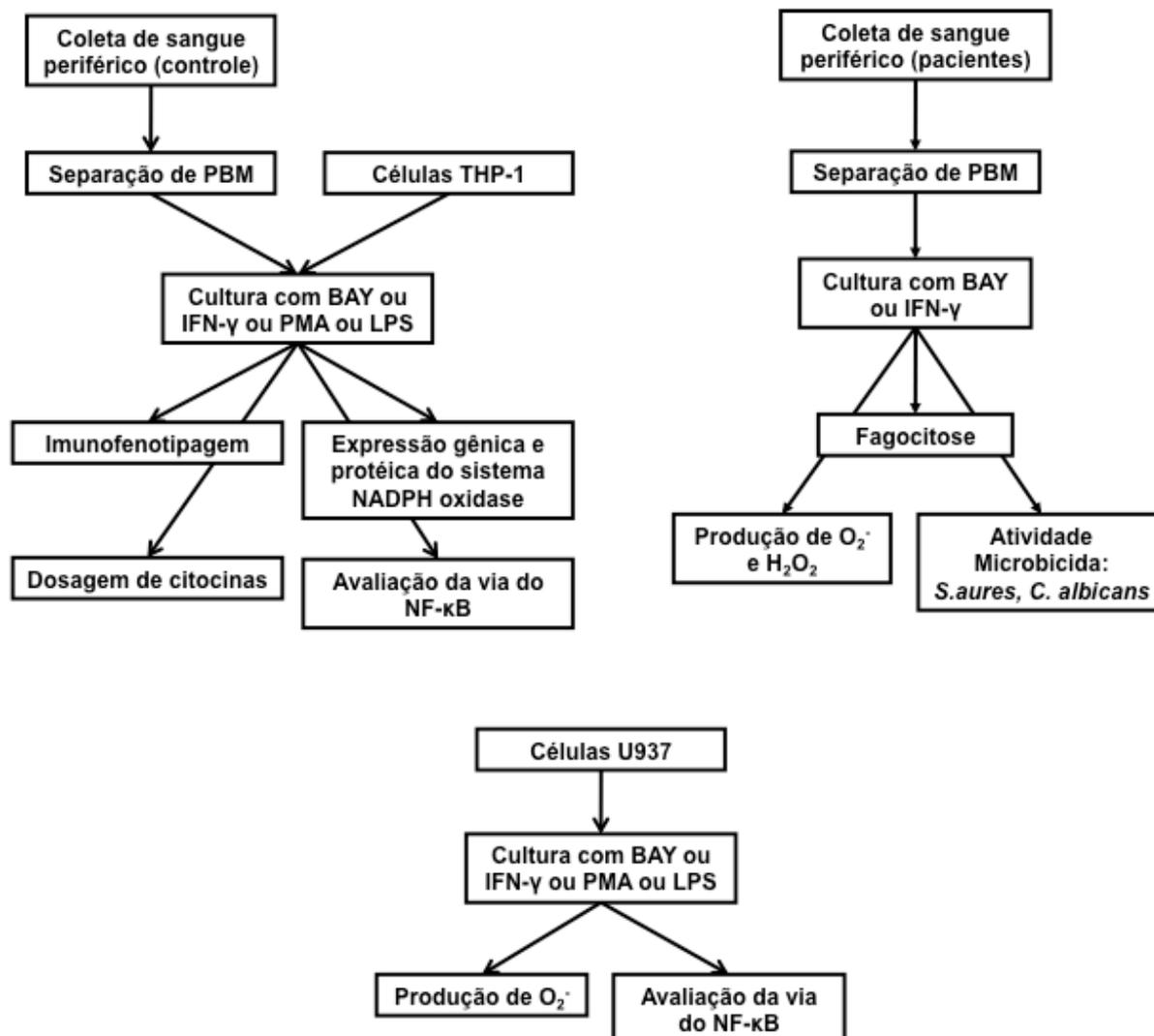
Figure 2. Experimental Mess

WWW.PHDCOMICS.COM JORGE CHAN © 2008

3.1 Algoritmos da Metodologia – Células Humanas

Os algoritmos da figura abaixo trazem os procedimentos realizados com linhagens celulares e monócitos humanos, em ordem, para melhor entendimento.

Figura 5 - Sequência de experimentos realizados com células THP-1, U937 e monócitos humanos



3.2 Células de Linhagem e Monócitos Humanos

3.2.1 Linhagens THP-1 e U937

As linhagens pró-monocíticas humanas THP-1, derivada de leucemia monocítica aguda, e U937, derivada de um linfoma histiocístico difuso, foram obtidas

da ATCC® (Washington, DC, EUA). As células U937 transfectadas com vetor plasmidial pCMV3 vazio (sem construção a ser expressa pela células) ou com vetor plasmidial pCMV3 contendo uma construção *FLAG-tag* de I κ B α mutante (troca das serinas nas posições 32 e 36 por alaninas) (**APÊNDICE A**) foram cedidas gentilmente pelo Dr. Carlos V. Payva (Asin et al., 1999). Ambas as linhagens são fagocíticas, não apresentando imunoglobulinas (citoplasmáticas ou de superfície). Estas linhagens podem ser induzidas a uma diferenciação terminal em células semelhantes a monócitos ou macrófagos por sobrenadantes de culturas de linfócitos, forbóis ésteres, vitamina D3, IFN- γ , TNF- α , e ácido retinóico, determinando a grande aplicabilidade dessas linhagens em nossos estudos.

As células THP-1 e U937 foram mantidas em nosso laboratório, por meio de repiques em períodos inferiores a 30 dias, fazendo-se a troca do meio de cultura acidificado a cada 48 horas. As condições de cultura encontram-se descritas na seção **3.3.1** a seguir.

3.2.2 *Casuística*

Além das linhagens celulares, o presente estudo envolveu a coleta de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis, considerados aqueles sem a presença de doença infecto-contagiosa ou congênita diagnosticada até o momento da coleta ou determinada até o fim da confecção da tese. Também participaram do estudo pacientes com imunodeficiências primárias definidas, com os respectivos defeitos moleculares conhecidos. No caso, pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC) e pacientes com deficiência de mieloperoxidase (MPO). No quadro abaixo caracterizamos os indivíduos participantes da pesquisa.

Quadro 1 - Características dos participantes da pesquisa

Pac.	Gênero	Idade	Diagnóstico	Gene afetado	Mutação	Agentes etiológicos isolados
p1	M	4	DGC	<i>CYBB</i>	962T→G cromossomo X	<i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
p2	M	6	DGC	<i>CYBB</i>	970delG cromossomo X	<i>S. aureus</i> , <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>
p3	F	12	deficiência de MPO	<i>MPO</i>	Ex12- 2A3C/R569W	<i>C. albicans</i>
p4	M	8	deficiência de MPO	<i>MPO</i>	Ex12- 2A3C/R569W	<i>C. albicans</i>

Pac.: paciente; M: masculino; F: feminino; DGC: Doença Granulomatosa Crônica; MPO: mieloperoxidase

Os pacientes que participaram do protocolo experimental apresentavam condições clínicas estáveis de saúde, evitando, desse modo, qualquer piora ou alteração no seu quadro. Como menores de idade, os pacientes encontravam-se acompanhados de um dos pais ou responsável no momento da coleta. A retirada de sangue só ocorreu após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Todos os procedimentos não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo, de acordo com a regulamentação da convenção de Genebra para pesquisa com seres humanos, e do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa, o protocolo experimental e o TCLE contemplam os quesitos éticos e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB – USP (Parecer 862/CEP).

3.2.3 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

As PBMC foram obtidas de um volume de 20 mL de sangue periférico coletados de indivíduos sadios ou 10 mL coletados dos pacientes com DGC e deficiência de MPO. As alíquotas de sangue foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 10 mM, pH = 7,4) em uma proporção 1:1 e, então, colocadas em camada sobre Ficoll-Hypaque (densidade = 1,077 g/mL; GE

Healthcare, Uppsala, Suécia), seguido de separação sob centrifugação durante 20 minutos a 900 x g, a 25 °C. Após essa centrifugação, obtivemos uma fração rica em leucócitos mononucleares e pobre em polimorfonucleares e eritrócitos. Após a obtenção das PBMC, procedemos o protocolo para separação de monócitos.

3.2.4 Isolamento de Monócitos a partir das PBMC

Para obtenção dos monócitos, as PBMC foram lavadas (300 x g por 10 minutos, 25 °C) aproximadamente 4 vezes em PBS (pH 7,2), tendo o sobrenadante adquirido uma característica translúcida, indicando a presença de poucas plaquetas. Na terceira lavagem o número de células foi determinado em câmara hemocitométrica modelo Neubauer (*Bright-line Hemocytometer*, Sigma). Para essa contagem realizou-se uma diluição em solução de azul de tripan (4%; Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), determinando a viabilidade celular. O sedimento resultante da última centrifugação foi ajustado para 1×10^7 células em 400 μ L de PBS. A essas células adicionamos microesferas metálicas marcadas com anti-CD16 (Miltenyi Biotec Ltd, Church Lane, Biscley, UK) e as incubamos por 15 minutos, a 4 °C. Após incubação, a suspensão celular foi passada por coluna magnética *MACS®Cell Separator* LS (Miltenyi Biotec Ltd) para obtenção das células CD16+ marcadas com as microesferas. A pureza do isolamento dos monócitos de sangue periférico (PBM) foi determinada pela análise por citometria de fluxo, usando anticorpos anti-CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e anti-CD163 (eBioscience, San Diego, CA, USA). Sendo um rendimento médio acima de 97% considerado adequado para realização dos experimentos.

3.3 Cultura Celular e Estimulação das Células

3.3.1 Cultura Celular

Os monócitos isolados do sangue periférico (PBM) e as células de linhagens (THP-1 e U937) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (LGC, São Paulo, SP, Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; inativado pelo calor; LGC), 2 mM de L-glutamina (LGC), 100 U/mL de penicilina (LGC) e 100 μ g/mL de estreptomicina (LGC). As células foram mantidas durante todas as estimulações a 37 °C, em

atmosfera úmida, saturada em 5% de CO₂, em condições livre de endotoxina (<10 pg/mL). O tempo de cultivo variou de acordo com protocolo realizado.

3.3.2 *Tratamentos Farmacológicos e outros Estímulos*

Além do fármaco a ser testado, BAY 41-2272, selecionamos uma série de ativadores de monócitos com vias de sinalização descritas e que estão envolvidos na resposta efetuada por essas células. Dentre esses podemos citar o acetato de forbol miristato (PMA, do inglês, *Phorbol-myristate-acetate*) e lipopolissacarídeo (LPS). As doses de BAY 41-2272 para o tratamento das células, foram definidas com base no trabalho de Borges de Oliveira-Junior et al. (2007) e em nosso trabalho de mestrado. Os estímulos utilizados, suas respectivas concentrações e breve descrição encontram-se no quadro abaixo. Os tempos dos tratamentos e/ou estímulos usados para realização de protocolo experimental específico foram descritos nos tópicos referentes a esses procedimentos.

Quadro 2 - Estímulos utilizados para a ativação das células THP-1, U937 e PBM

Estímulo	Concentração final utilizada	Descrição	Fabricante
BAY 41-2272	1 ou 3 μ M	Agonista de Guanilato Ciclase solúvel	BAYER
IFN- γ	100 U/mL	Citocina ativadora de monócitos	R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA)
TNF- α	1000 U/mL	Citocina pró-inflamatória	R&D Systems
PMA	100 nM	Ativador de proteína quinase C	Sigma-Aldrich
LPS (<i>Escherichia coli</i> O111:B4)	30 ng/mL	Agonista de TLR4 (componente da membrana de bactérias gram-negativas)	Sigma-Aldrich
Ionomicina	0,5 μ M	Ionóforo de cálcio	Sigma-Aldrich
ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one)	100 μ M	Inibidor de Guanilato Ciclase solúvel	Sigma-Aldrich
DT-3	1 μ M	Inibidor de proteína quinase G alfa permeável a membrana	Merck
Zymosan A	proporção de 10 partículas : 1 fagócito	Agonista de TLR2 e Dectina-1 (polissacarídeo obtido a partir de parede celular de <i>S. cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich
<i>S. aureus</i>	proporção de 10 bactérias : 1 fagócito	Bactéria gram-positiva responsável por diversos tipos de infecção (p.ex. pneumonia)	ATCC
<i>C. albicans</i>	proporção de 1 leveduras : 2 fagócitos	Fungo diplóide causador de infecções oportunistas (forma de levedura)	ATCC
PBS (solução salina tamponada com fosfato)	10 mM	Solução salina tamponada (pH = 7,4) usada como controle	Manufaturada
DMSO (dimetilsulfóxido)	0,7 %	Diluyente do fármaco usado como controle	Sigma-Aldrich

3.4 Caracterização Imunofenotípica das Células

Avaliamos a expressão de marcadores de superfície envolvidos com reconhecimento e ativação dos monócitos. Para cada molécula analisada, utilizamos um anticorpo monoclonal específico marcado com fluorocromo, o que nos possibilitou a avaliação por citometria de fluxo. A relação de anticorpos utilizados encontra-se no quadro abaixo.

Quadro 3 - Marcadores de superfície avaliados por citometria de fluxo

Proteína	Descrição	Fluorescência	Empresa
CD11b	MAC-1 / Receptor 3 do complemento	PE	BD Biosc. ¹
CD18	Subunidade β de CR3	FITC	BD Biosc.
CD14	Co-receptor juntamente com TLR4 para LPS	APC	BD Biosc.
TLR4	Reconhece LPS	PE	eBiosc. ²
TLR2	reconhece lipoproteínas e lipopeptídeos de microrganismos	Alexa Fluor® 488	BD Biosc.
CD163	Receptor <i>scavenger</i> ; reconhece componentes de <i>S. aureus</i>	Alexa Fluor® 647	eBiosc.
gp91 ^{PHOX}	Componente do sistema NADPH oxidase (Citocromo <i>b</i> ₅₅₈)	FITC	eBiosc.

¹ BD Biosc. – BD Biosciences; ² eBiosc. – eBiosciences.

As células THP-1 e PBM (1×10^6) foram tratadas ou não por 48 horas com BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M), PMA (100 nM), ou IFN- γ (100 U/mL) juntamente com TNF- α (1000 U/mL). Após esse tempo, realizamos o bloqueio dos receptores Fc incubando as células com PBS contendo 10% de soro humano AB (LGC) e 2% de SFB (LGC) durante 10 minutos para evitar fluorescência inespecífica. As suspensões celulares (100 μ L, 1×10^6 células) foram então transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL com fundo arredondado (tubos de citometria). A cada tubo foram adicionados o conjunto de anticorpos em concentrações específicas (de forma a não usar anticorpos com fluorocromos iguais ou com comprimentos de emissão semelhantes), sendo incubadas por 30 minutos, a 4 °C, em ambiente escuro. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 2% de SFB (900 x g por 5 minutos, a 4 °C), recolhidas em tubos de citometria, fixadas em

solução de paraformaldeído (1% em PBS) e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto® II (BD Biosciences).

A região das células a serem analisadas foi determinada em escala linear usando os parâmetros de *forward* (FSC) versus *side scatter* (SSC), indicativos de tamanho e complexidade celular, respectivamente. Após a seleção das células, fez-se a aquisição de 20000 eventos em cada amostra para avaliação dos marcadores (escala logarítmica). A compensação entre os canais de fluorescências foi realizada para aperfeiçoar a aquisição dos dados. Para a análise utilizou-se o software *FlowJo* (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). Finalmente, os histogramas para os marcadores foram feitos a partir dos eventos adquiridos. Os dados encontram-se apresentados em mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

3.5 Produção de Citocinas

Para esta avaliação utilizamos os sobrenadantes das culturas das células THP-1 e monócitos tratados ou não com BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M), PMA (100 nM), ou IFN- γ (100 U/mL) juntamente com TNF- α (1000 U/mL). Vale ressaltar que, para dosagem de TNF- α o tratamento conjunto IFN- γ mais TNF- α não foi realizado, sendo feito apenas estímulo com IFN- γ . O tempo de tratamento foi de 24 horas para dosagem de TNF- α , IL-1 β e IL-6, e de 48 horas para dosagem de IL-12p70. A dosagem foi realizada pelo método ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando-se kits BD OptEIA™ (BD Biosciences).

Resumidamente, as placas para ELISA (*high-binding* de 96 poços; BD Biosciences) foram revestidas adicionando-se 100 μ L de anticorpos monoclonais de captura de antígenos para as citocinas citadas acima, em concentrações específicas, e incubadas por 18 horas a 4 °C. As placas foram então lavadas com PBS mais Tween® 20 (0,05%; Promega, Madison, WI, EUA) e bloqueadas por duas horas com 200 μ L de solução de albumina bovina (BSA, 1 %; Sigma-Aldrich) e sacarose (5%; Synth, Diadema, SP., Brasil) em PBS. Após este período, as placas foram lavadas novamente, e 50 μ L dos sobrenadantes de cultura ou da curva padrão de citocinas recombinantes, em duplicata, foram colocados para incubação por mais duas horas a 22 °C. Após nova lavagem, foram adicionados 100 μ L de anticorpo policlonal secundário biotilado (liga-se às citocinas) e incubados durante duas horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e incubadas

com peroxidase (*Horseradish Peroxidase*; Sigma-Aldrich) conjugada à avidina (1,25 ng/mL em PBS + BSA 1 %; Genzyme Diagnostics), por 20 minutos, a 37°C. Após 3 lavagens com PBS, foram adicionados 100 µL de reagente tetrametilbenzidina (TMB®; Sigma-Aldrich) para revelar a reação. Após 30 minutos a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (30 %) e a absorbância lida em comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão feita com as respectivas citocinas recombinantes humanas, utilizadas numa diluição seriada a partir de 2.000 até 15,62 pg/mL. Especificamente para IL-6 a curva padrão foi feita em uma diluição de 20 a 0,5 ng/mL. Os resultados da absorbância foram analisados por regressão linear no programa Prism 4.0 (GraphPad Softawer Inc., La Jolla, CA, EUA). As concentrações de citocinas das amostras encontram-se representadas em pg/mL.

3.6 Avaliação do Sistema NADPH Oxidase

3.6.1 Expressão Gênica de *CYBA*, *CYBB*, *NCF1* e *NCF2*

Para avaliação da expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase, os PBM, células THP-1 e células U937 (5×10^6 células) foram submetidos aos tratamentos com BAY 41-2272 (1 ou 3 µM) ou IFN-γ (100 U/mL) por 48 horas. Para as células U937 foram avaliadas somente as expressões de *NCF2* e *CYBB*, sendo que este último não foi avaliado para as células THP-1 e PBM.

O RNA total das células tratadas foi obtido pelo método de Trizol® reagent (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e depois submetido a transcrição reversa usando *kit* Super Script III RT e OligoDT *primers* (Life Technologies) (Quadro 3). A quantificação relativa dos genes em questão (*primers* na Quadro 4) foi realizada por PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) em tempo real, usando *SYBR Green PCR Reagents* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e efetuada em termociclador ABI 5700 (Applied Biosystems) como descrito previamente (Borges de Oliveira-Junior et al., 2007; Quadro 5). A expressão dos componentes da NADPH oxidase foi normalizada pela da β-actina, calculando-se a razão dos níveis de expressão dos genes alvos (sistema NADPH oxidase) pela expressão do gene constitutivo (β-actina).

Quadro 4 - Reagentes e condições usados para reação de transcrição reversa

1ª Etapa	2ª Etapa
2 µL RNA total (2 µg) 0,5 µL OligoDT ¹ (1,25 µM) 1,6 µL dNTP ¹ (0,8 µM) 5,9 H ₂ O DEPC	1,2 µL MgCl ₂ ¹ (1,2 mM) 2,0 µL Buffer ¹ (1 X) 1,0 µL DTT ¹ (5 mM) 0,5 µL Inibidor de RNase ¹ (10 U/µL) 5,0 µL H ₂ O DEPC 0,3 µL MultiScribe Transcriptase ¹ (15 U)
Ciclo	Ciclos
65 °C/15' (1 ciclo)	42 °C/50' (1 ciclo) → 75 °C/15' (1 ciclo) → 4 °C/∞

¹ Life Technologies**Quadro 5** - Relação de *primers*¹ utilizados

Gene / Proteína	Primer foward	Primer reverse
<i>CYBA</i> / p22 ^{PHOX}	5'-atg tgg gcc aac gaa c'ag- 3'	5'-gta ctc cag cag gca cac aa- 3'
<i>NCF1</i> / p47 ^{PHOX}	5'-cct ctt tcc agt gca ttt aag g-3'	5'-gat gtg acg gat gaa gtt gtc- 3'
<i>NCF2</i> / p67 ^{PHOX}	5'-cgg aca aga agg act gga ag -3'	5'-gga agt aag cca ctg cca ag- 3'
<i>ACTB</i> / β-actina	5'-tca ccg agc gcg gct-3'	5'-taa tgt cac gca cga ttt ccc-3'

¹ Life Technologies**Quadro 6** - Reagentes e ciclos utilizados para reação de PCR em tempo real

Corrida de amplificação	Curva de dissociação
5 µL SYBR Green Master Mix 3 µL (2 µg) de cDNA 2 µL par de primers ¹ (5 pmol/µL cada)	NA
Ciclos	Ciclos
50 °C/2' (1 ciclo) → 95 °C/10'(1 ciclo) → 95 °C/15" – 60 °C/1' (40 ciclos)	95 °C/15" – 60 °C/1' – 95 °C/15"

¹ Life Technologies; NA: não se aplica

3.6.2 Avaliação da Expressão Protéica de p22^{PHOX}, p47^{PHOX}, p67^{PHOX} por Western blot

Após tratamento com BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M) ou IFN- γ (100 U/mL) por 48 horas, as células THP-1 e PBM (1×10^7 células) foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL e centrifugadas a 300 x g por 8 minutos, a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em tampão SDS (62,5 mM Tris-HCL pH= 6,8, 2% SDS, 10% TDT, 50 mM glicerol e 0,1% azul de bromofenol – 20 μ L para cada 1×10^6 células). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 95 °C por 10 minutos.

Para realização do *Western blot* propriamente, foram utilizados 20 μ L do extrato celular total (equivalente a 1×10^6 células). Ferveu-se o extrato por 5 minutos para desnaturar as proteínas, sendo as amostras submetidos a eletroforese em gel de tris-poliacrilamida separador a 12 % sobreposto a gel concentrador a 4% (90 volts por 2 horas). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (45 volts por 90 minutos). Os *blots* foram então lavados com TBS (do inglês, *Tris buffered saline*) por 5 minutos a 22 °C. Em seguida, foram bloqueados por uma hora com TBS mais Tween® 20 (0,1 %; Promega) (TBS/T) acrescido de 5 % de leite em pó a 22 °C, sendo posteriormente lavados três vezes com TBS/T. Após essa lavagem, os *blots* foram incubados por 18 horas a 4°C com anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas (Quadro 7) na diluição adequada (TBS/T + 5% de leite em pó). Após a incubação, os *blots* foram lavados três vezes com TBS/T (5 minutos por lavagem), e incubados por uma hora a temperatura ambiente com um anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*; Life Technologies). Após a incubação, os *blots* foram lavados três vezes com TBS/T, sendo revelados usando *kit* Phototope-HRP de detecção de *Western blot* (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). As bandas foram visualizadas expondo a membrana a um filme de raio X (BioMax MR, Eastman Kodak Company) de 15 segundos a 15 minutos.

Quadro 7 - Componentes do sistema NADPH oxidase avaliados por *Western Blot*

Proteína	Anticorpo	Diluição	Empresa
p22 ^{PHOX}	goat anti-p22 ^{PHOX}	1:150	Santa Cruz ¹
p47 ^{PHOX}	goat anti-p47 ^{PHOX}	1:150	Santa Cruz
p67 ^{PHOX}	goat anti-p67 ^{PHOX}	1:500	Santa Cruz
β-actina	mouse anti-β-actina	1:250	Santa Cruz

¹ Santa Cruz: Santa Cruz Biotchnologies

Para a quantificação, retiramos os anticorpos dos *blots* através de uma lavagem em água por 5 minutos a 22 °C. Em seguida, incubamos por 5 minutos com hidróxido de sódio (0,2 M; NaOH) e lavamos duas vezes em água por 5 minutos, a 22 °C. Os *blots* foram então bloqueados com TBS/T acrescido de 5% de leite em pó, lavados três vezes em TBS/T, e incubados por duas horas a 22 °C com um anticorpo anti-β-actina. Em seguida, os *blots* foram lavados três vezes com TBS/T por 5 minutos, e incubados por uma hora (22 °C) com anticorpo conjugado com HRP (do inglês *horseradish peroxidase*), e revelados como descrito acima. Após revelação, a análise densitométrica foi realizada utilizando o software ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Os níveis de proteína total foram normalizados em relação ao nível da proteína β-actina para cada amostra.

3.6.3 Liberação de Espécies Reativas de Oxigênio

A avaliação da produção e liberação de reativos de oxigênio foi feita com os monócitos de sangue e células U937. Para isso, os PBM dos pacientes e controles (1 x 10⁶ células) foram tratados por 48 horas com BAY 41-2272 (1 ou 3 μM) ou IFN-γ (100 U/mL). Após o tratamento, as células foram estimuladas com PMA (30 nM), *S. aureus* (10 bactérias : 1 fagócito) ou *C. albicans* (1 levedura : 2 fagócitos) na presença de lucigenina (1 mM; Sigma-Aldrich) ou luminol (1 mM; Sigma-Aldrich) para avaliação da produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente.

As células U937, por sua vez, passaram por dois protocolos diferentes. No primeiro, de forma “crônica”, as U937 foram tratadas por 48 horas com BAY 41-2272 (1 ou 3 μM), sendo posteriormente estimuladas com PMA (30 nM) ou LPS (30 ng/mL), na presença de lucigenina (1 mM). No segundo protocolo, de forma “aguda”, as células foram estimuladas diretamente por duas horas com BAY 41-2272 (1 ou 3 μM), ou PMA (30 nM) ou LPS (30 ng/mL), na presença de lucigenina (1 mM).

Uma vez realizados os protocolos de tratamento, a produção de espécies reativas de oxigênio foi mensurada por medida de quimioluminescência, como descrito previamente (Rebecchi et al., 2000). A reação foi monitorada durante duas horas usando um luminômetro de microplacas (EG&G Berthold LB96V, Bad Wilbad, Alemanha) e os resultados foram apresentados como unidades relativas de luz (URL). Os níveis mais altos de URL foram utilizados para calcular a média da máxima produção de reativos de oxigênio, no período de tempo estudado.

3.7 Avaliação da via do NF- κ B

3.7.1 Degradação do I κ B α e Fosforilação do NF- κ B (p65)

Para uso da citometria de fluxo na identificação de fatores de transcrição, adaptamos o protocolo feito por Stjernberg-Salmela e colaboradores (2009), excluindo a etapa de lise de hemácias, uma vez que fizemos o isolamento dos PBM (3.2.3) e usamos células de linhagem THP-1. Nestas células procedemos o tratamento, fixação e permeabilização, sendo as THP-1 e PBM (1×10^6 em 100 μL) reservadas em tubo cônico de 15 mL a 37 °C.

As células foram tratadas ou não com BAY 41-2272 (1 ou 3 μM) ou TNF- α (1000 U/mL) ou PMA (30 nM) juntamente com ionomicina (0,5 μM), e os tubos foram incubados a 37 °C por 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Após a incubação, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído (4 % em PBS por 10 minutos a 22 °C; Sigma-Aldrich), seguida de duas lavagens com PBS (200 x g por 7 minutos). Para permeabilização, o precipitado foi ressuspenso em solução de Triton X-100 (0,5% em PBS por um minuto a 22 °C; Sigma-Aldrich), seguido de duas lavagens em PBS (200 x g por 7 minutos a 22 °C). Após a permeabilização, as células foram ressuspenso em 100 μL de PBS (0,1% de Triton X-100) e adicionamos os anticorpos primários para marcação de I κ B α ou pNF- κ B (p-p65) (30 minutos a 22 °C,

em ambiente escuro; Quadro abaixo). Após a marcação primária, as células foram lavadas e ressuspensas como na etapa pós permeabilização e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluorescência (30 minutos a 22 °C, em ambiente escuro; Quadro abaixo). Por fim, as células foram lavadas duas vezes em PBS (200 x g por 7 minutos) e ressuspensas em solução de paraformaldeído 1 % em PBS para análise por citometria de fluxo.

Quadro 8 - Anticorpos utilizados para avaliação da via NF- κ B

Proteína	Anticorpo	Diluição	Empresa
CD14	mouse anti-CD14 FITC	1:50	BD Biosc. ¹
I κ B α	rabbit anti-I κ B α (C-15)	1:200	Santa Cruz. ²
pNF- κ B (p65) (pS529)	rabbit anti-p65 (K10-895.12.50)	1:150	BD Biosc.
IgG	goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 647	1:150	Santa Cruz.

¹ BD Biosc.: BD Biosciences; ² Santa Cruz: Santa Cruz Biotechnology.

Antes das etapas de fixação e permeabilização, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal CD14 (15 minutos a 4 °C). A aquisição e análise dos dados foram feitas em citômetro FACSCanto II e FACS Diva software (BD Biosciences), respectivamente. Além dos parâmetros de tamanho e complexidade, fizemos a marcação com anticorpo anti-CD14 para garantir a identificação mais fidedigna dos monócitos. Foram adquiridos 20000 eventos, como descrito previamente (**seção 3.4**). Finalmente, os histogramas para I κ B α ou pNF- κ B foram feitos e os dados encontram-se apresentados em mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

3.7.2 Avaliação de Células Knockdown para NF- κ B

Como descrito anteriormente, utilizamos células U937 transfectadas com um vetor contendo um I κ B α mutante, que impede seu desligamento do NF- κ B, inativando essa via. O modelo nos permitiu avaliar a participação e necessidade desse fator de transcrição na resposta ao tratamento com o BAY 41-2272 em relação ao sistema NADPH oxidase. Para tanto foram avaliadas, durante e/ou após tratamento com o fármaco em questão, a produção de ânion superóxido e expressão

dos genes *CYBB* e *NCF2* (dependentes de NF- κ B). Os protocolos de tratamento e avaliação dessas respostas encontram-se descritos nas seções anteriores **3.3.2**, **3.6.1** e **3.6.3**.

3.8 Avaliação da Resposta a Patógenos

3.8.1 Fagocitose de Zymosan, S. aureus e C. albicans

A avaliação da função fagocítica foi realizada somente com monócitos de pacientes e controles sadios. A fagocitose foi analisada por citometria de fluxo de acordo com o método descrito por Hasui et al. (1989). Para tanto os PBM (100 μ L, $0,5-1 \times 10^6$ células), tratados ou não com BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M) ou IFN- γ (100 U/mL) por 48 horas, foram incubados por uma hora a 37 °C com partículas de zymosan (10 partículas : 1 fagócito; Sigma-Aldrich), ou *S. aureus* (10 bactérias : 1 fagócito), ou *C. albicans* (1 levedura : 2 fagócitos) marcados com FITC (isotiocianato de fluoresceína, 5 μ g/mL; Sigma-Aldrich). Os patógenos marcados foram inativados pelo calor (1 hora a 100 °C). Em seguida as culturas foram lavadas com 500 μ L de PBS para eliminar as bactérias, leveduras ou partículas não internalizadas, centrifugando os tubos a 600 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 400 μ L de PBS. Por fim a fluorescência das partículas/fungos/leveduras não internalizados foi bloqueada pela adição de azul de tripan (0,04%). Após o bloqueio a atividade fagocítica foi analisada em citômetro de fluxo FACSCanto® II (BD Biosciences). A aquisição e análise foram feitas como descrito anteriormente na **seção 3.4**. A partir dessa análise obtivemos os dados de porcentagem da população celular com atividade fagocítica e a quantidade de partículas fagocitadas (sugerida pela mediana da intensidade de fluorescência, MIF).

3.8.2 Atividade Microbicida contra S. aureus e C. albicans

Para avaliar a atividade microbicida, usamos um microensaio de oxidação de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) pelas bactérias ou fungos recuperados da co-cultura com os monócitos. Assim como para atividade fagocítica, o potencial microbicida foi avaliado somente com monócitos de pacientes e indivíduos sadios. Para tanto, os PBM (1 x 10^6 células)

foram tratados ou não com BAY 41-2272 (1 ou 3 μM) ou IFN- γ (100 U/mL), por 48 horas. Após as preparações das células, $2,5 \times 10^5$ destas foram suspensas em 200 μL de meio RPMI 1640 sem suplementação (sem vermelho de fenol; LGC), e distribuídas em placas de cultura de 96 poços. Em seguida, foram adicionados *S. aureus* (10 bactérias : 1 fagócito) ou *C. albicans* (1 levedura : 2 fagócitos). Essa cocultura foi incubada por duas horas a 37 °C. Após a incubação a placa foi centrifugada (900 x g, 8 minutos, 25 °C) e o sobrenadante recolhido e armazenado a -80 °C para posterior dosagem de citocinas. O *pellet* de células foi lavado duas vezes com PBS (900 x g, 8 minutos, 25 °C) para retirada dos patógenos não fagocitados. Após as lavagens, adicionamos Triton X-100 (1,5%) por 10 minutos a 22 °C, para lise dos fagócitos e liberação dos patógenos englobados. A placa foi lavada mais duas vezes com PBS (900 x g, 8 minutos, 22 °C) para retirada do Triton X-100. Adicionamos então 100 μL de MTT (0,5 mg/mL em PBS), incubando os patógenos recuperados por mais duas horas a 22 °C e protegido da luz. Após essa incubação, adicionamos 100 μL de DMSO para liberação do precipitado de formazan (MTT reduzido) para o sobrenadante e incubamos por mais 30 minutos para sua total solubilização. Após esse tempo, as placas foram centrifugadas (300 x g, 3 minutos) e os sobrenadantes coletados e transferidos para outra placa. A absorbância foi determinada a um comprimento de onda de 570 nm em leitor de microplacas (Dynatech Laboratories Inc.). A conversão de absorbância para porcentagem de morte foi feita pela fórmula:

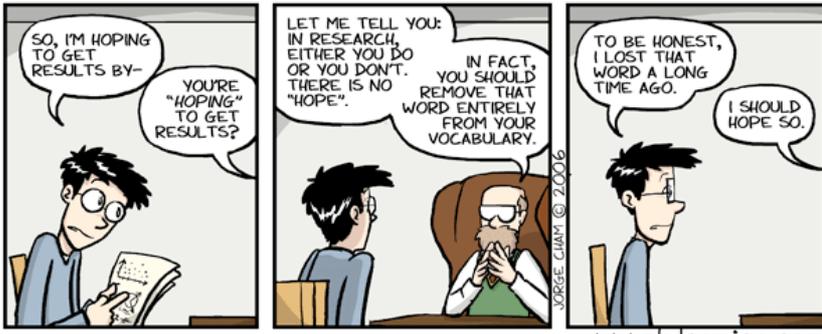
$$1 - \left[\frac{(\text{DO da amostra}) - (\text{DO } 90\% \text{ killing})}{(\text{DO } 10\% \text{ killing}) - (\text{DO } 90\% \text{ killing})} \right] \times 100$$

onde DO corresponde a densidade óptica (absorbância) adquirida. Esse cálculo baseia-se em uma curva de 100 a 10% das concentrações de patógenos incubadas com os PBM.

3.9 Análise Estatística

Após a obtenção dos dados brutos (dados numéricos dos parâmetros analisados), procedemos a análise de distribuição destes por teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para os dados com distribuição não Gaussiana, aplicamos o teste não paramétrico de Mann Whitney seguido do teste de Tukey. No caso dos

dados com distribuição Gaussiana, aplicamos análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Para as análises envolvendo pacientes usamos teste de Fisher, alternativa ao teste qui-quadrado para amostras com n menor que 20. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, a probabilidade de $p < 0,05$ capaz de revelar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os dados dos diferentes grupos (da Silva, 2003). Todas as análises foram realizadas no programa *Prism for Mac 4.0* (GraphPad Software Inc.).



www.phdcomics.com

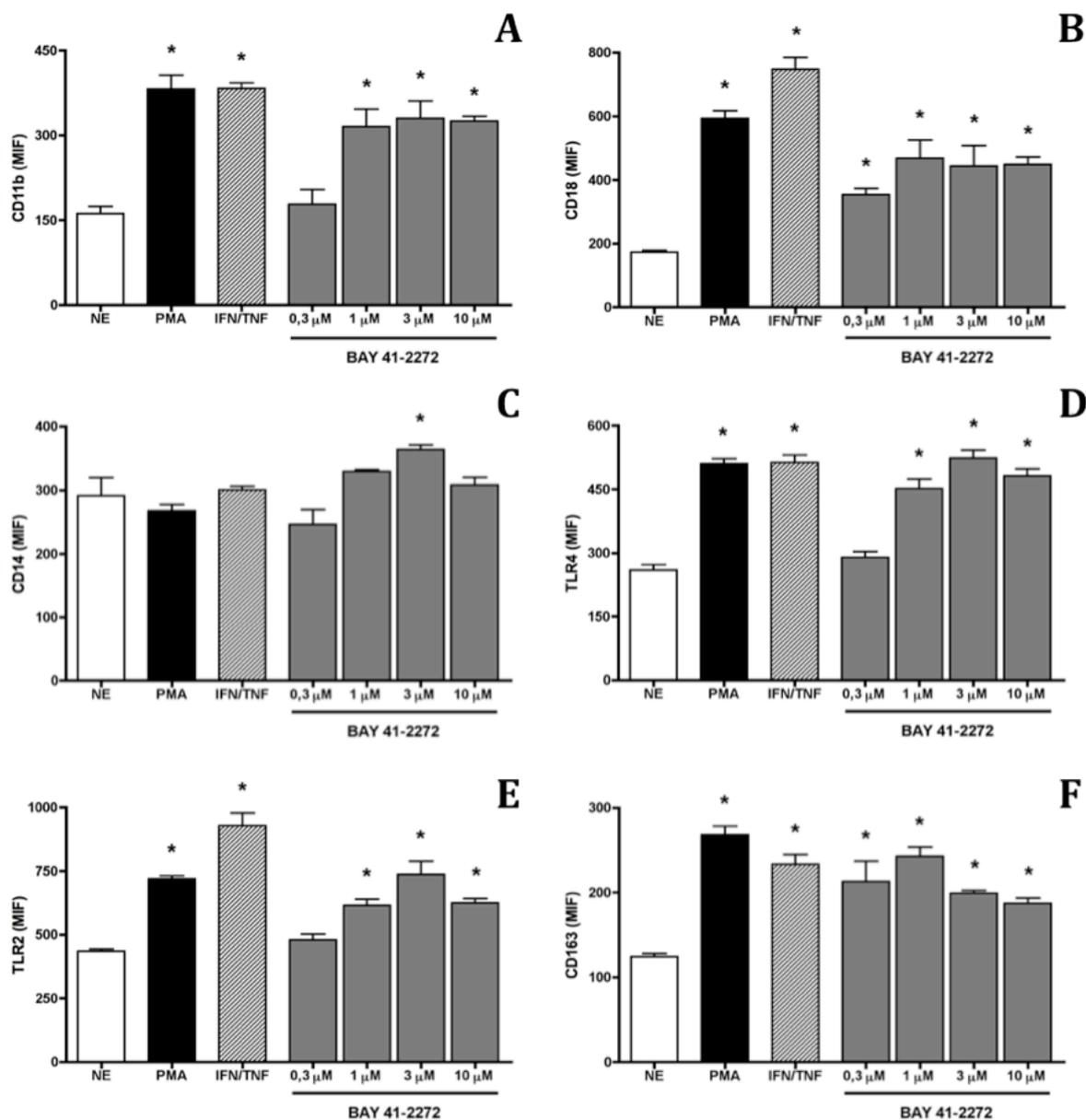
4.1 Pré-tratamento com BAY 41-2272 altera o Perfil Imunofenotípico de Células THP-1 e Monócitos de Sangue (PBM)

Como forma de evidenciar o papel do BAY 41-2272 na diferenciação e pré-ativação dos fagócitos mononucleares, analisamos a expressão de importantes marcadores – moléculas de superfície celular – envolvidos com a reposta eficaz dessas células. Ainda, os níveis desses marcadores são indicativos do grau de diferenciação no qual as células se encontravam após o estímulo.

O estímulo *in vitro* com BAY 41-2272, em 48 horas de cultura, foi associado com alterações do fenótipo das células THP-1 e monócitos de sangue (PBM), como caracterizado por citometria de fluxo (**Figuras 6 e 7**). Essas alterações, de forma geral, mostraram ser dose-dependentes, tendo as concentrações de 1 e 3 μM sido mais efetivas.

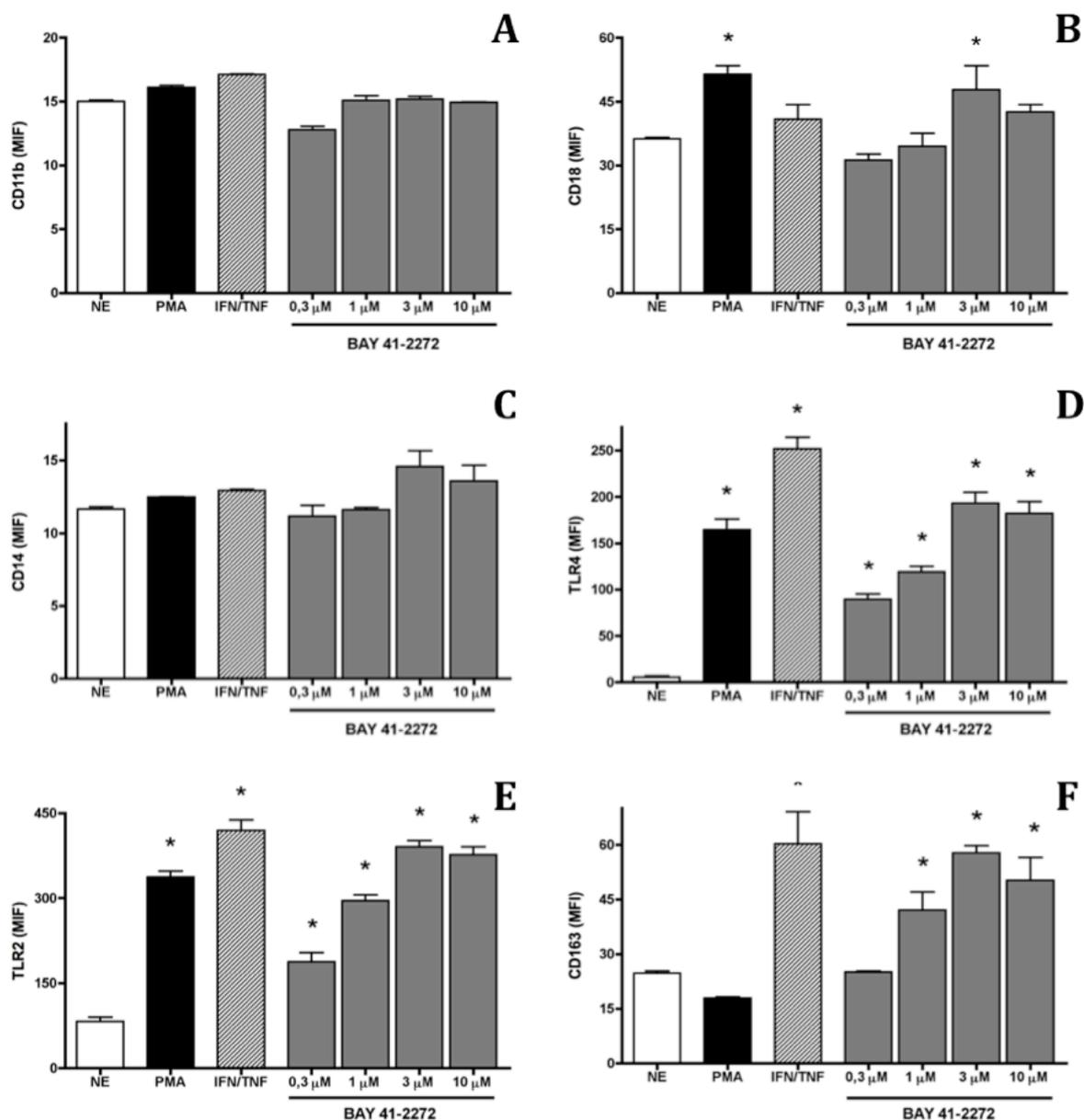
Em monócitos de sangue periférico o tratamento com BAY 41-2272 aumentou significativamente, em resposta a pelo menos uma das doses testadas, a expressão de CD11b, CD18, CD14, TLR4, TLR2 e CD163 (**Figura 6**). Nas células THP-1, o tratamento com BAY 41-2272 aumentou a expressão de CD18, TLR4, TLR2 e CD163 (**Figura 7 B,E-F**), não alterando significativamente a expressão de CD11b e CD14 (**Figura 7 A e C**).

Figura 6 - BAY 41-2272 induz a expressão de CD11b, CD18, CD14, TLR4, TL2 e CD163 em monócitos de sangue periférico



Os PBM (1×10^6) foram tratados por 48 horas com PMA (100 nM), IFN- γ (100 U/mL) associado a TNF- α (1000 U/mL) (IFN/TNF) ou BAY 41-2272 (0,3, 1, 3 e 10 μ M). Após tratamento, as células foram marcadas para avaliação da expressão de CD11b (A), CD18 (B), CD14 (C), TLR4 (D), TLR2 (E) e CD163 (F) por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm s.e.m, (n = 12 indivíduos, em triplicata). * para ANOVA, $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

Figura 7 - BAY 41-2272 induz a expressão de CD18, TLR4, TL2 e CD163 em células THP-1



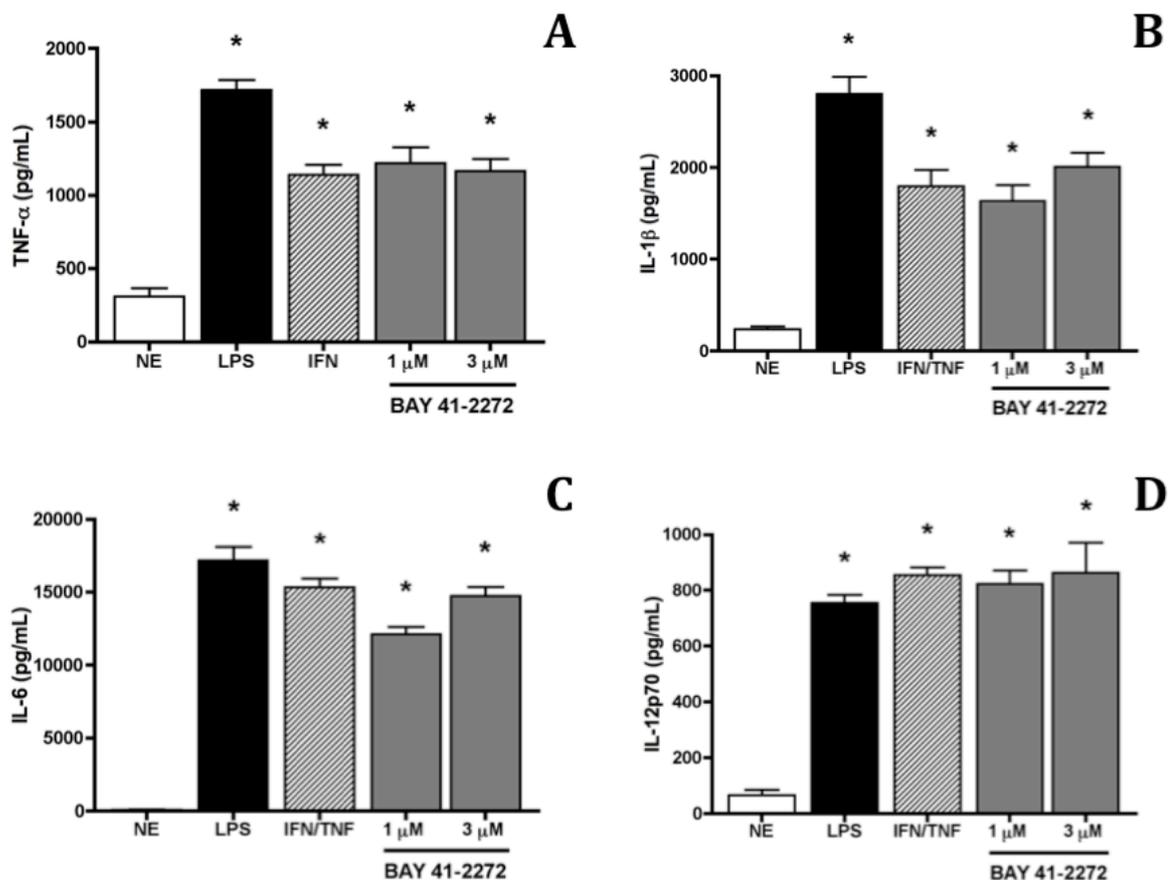
As células THP-1 (1×10^6) foram tratadas por 48 horas com PMA (100 nM), IFN- γ (100 U/mL) associado a TNF- α (1000 U/mL) (IFN/TNF) ou BAY 41-2272 (0,3, 1, 3 e 10 μ M). Após tratamento, as células foram marcadas para avaliação da expressão de CD11b (A), CD18 (B), CD14 (C), TLR4 (D), TLR2 (E) e CD163 (F) por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm s.e.m, (n = 5 experimentos, em triplicata). * para ANOVA, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE).

4.2 Pré-tratamento com BAY 41-2272 Induz um Perfil Pró-inflamatório nas Células THP-1 e Monócitos de Sangue (PBM)

A detecção das citocinas produzidas pelas células do sistema imune é um importante indicador do tipo e grau da resposta induzida por estímulos específicos.

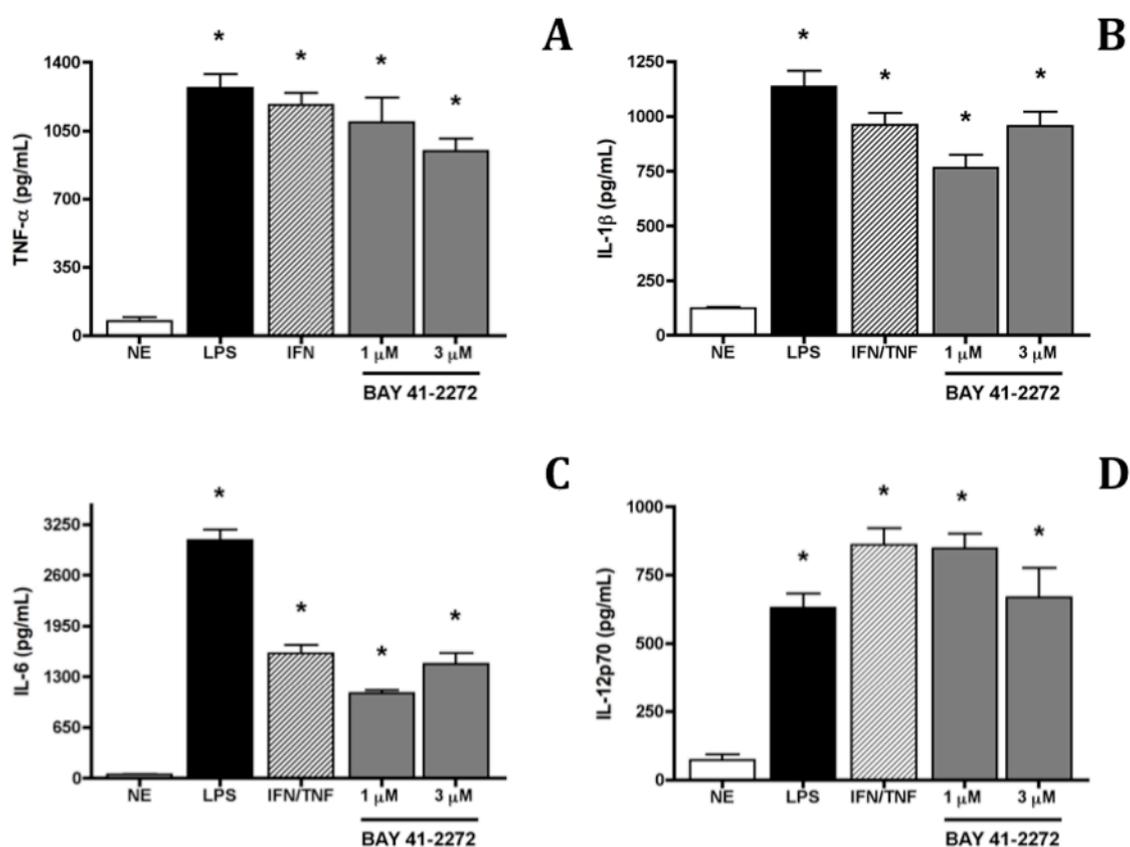
O tratamento com BAY 41-2272, por 24 ou 48 horas, induziu de forma significativa a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12p70 por PBM e células THP-1 (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - BAY 41-2272 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias por PBM



Os PBM (1×10^6) foram tratados por 24 ou 48 horas com LPS (30 ng/mL), IFN- γ (100 U/mL) associado ou não a TNF- α (1000 U/mL) (IFN/TNF) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de TNF- α (A, 24 horas), IL-1 β (B, 24 horas), IL-6 (C, 24 horas) e IL-12p70 (D, 48 horas) por ELISA. Os resultados expressam a média \pm s.e.m da concentração de citocinas (pg/mL) da cultura de PBM (n = 12 indivíduos, em triplicata). * para ANOVA, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE).

Figura 9 - BAY 41-2272 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias por células THP-1



As células THP-1 (1×10^6) foram tratadas por 24 ou 48 horas com LPS (30 ng/mL), IFN- γ (100 U/mL) associado ou não a TNF- α (1000 U/mL) (IFN/TNF) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de TNF- α (A, 24 horas), IL-1 β (B, 24 horas), IL-6 (C, 24 horas) e IL-12p70 (D, 48 horas) por ELISA. Os resultados expressam a média \pm s.e.m da concentração de citocinas (pg/mL) da cultura de THP-1 (n = 5 experimentos, em triplicata). * para ANOVA, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE).

4.3 Ativação do Sistema NADPH Oxidase pelo Tratamento com BAY 41-2272

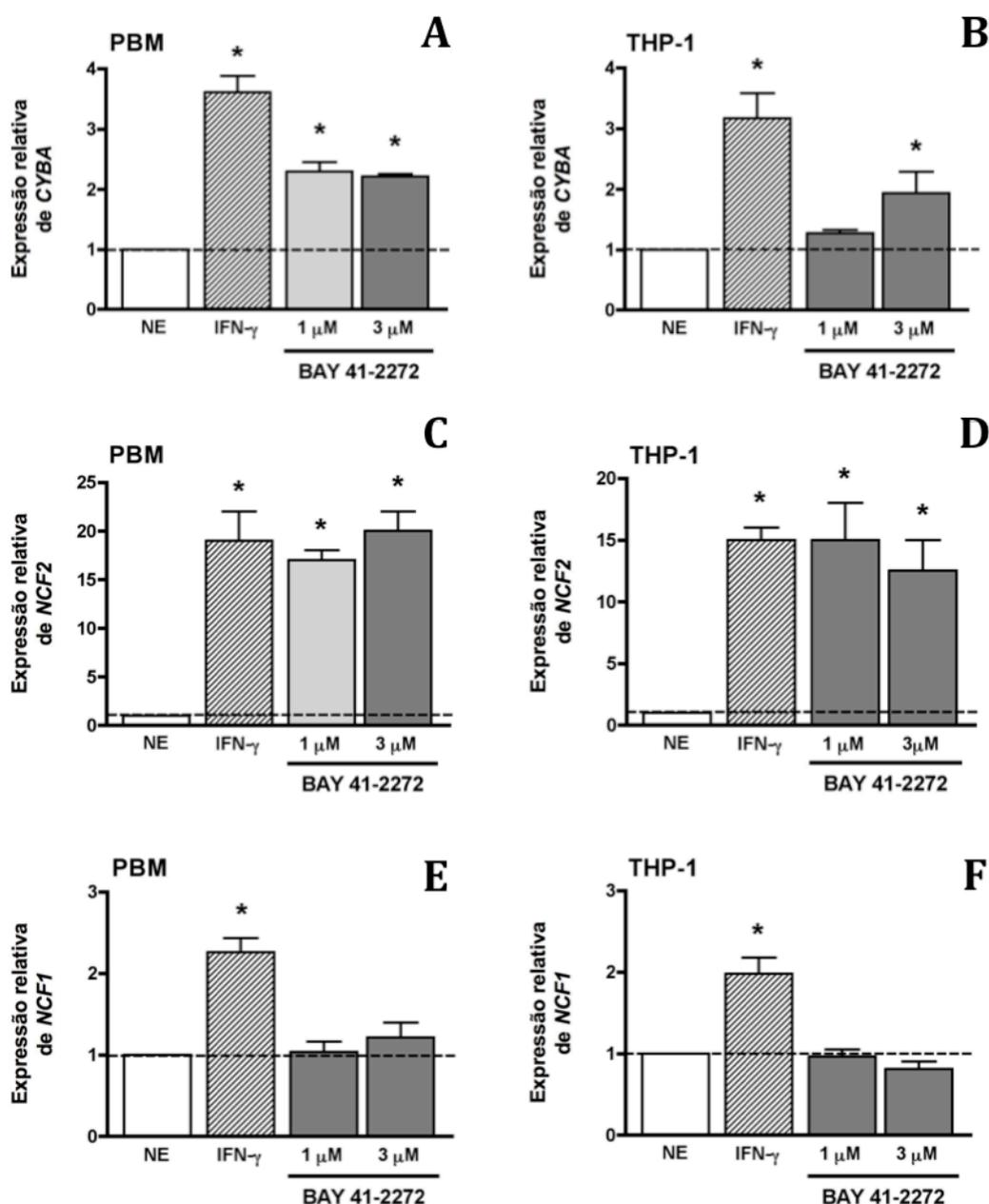
Um dos mecanismos de resposta mais eficientes dos fagócitos, no contexto do controle de infecções, é a ativação do sistema NADPH oxidase. Uma vez que já mostramos o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio induzido pelo BAY 41-2272, em nosso mestrado, nos propusemos avaliar a expressão gênica e protéica dos componentes desse sistema, importantes indicadores da atividade dos fagócitos mononucleares.

Os PBM e células THP-1 (5×10^6) foram tratadas por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células foram lisadas para obtenção do RNA mensageiro e avaliação da expressão de *CYBA* (A, B), *NCF2* (C, D) e *NCF1* (E, F) por PCR em tempo real. Os resultados representam a média \pm s.e.m da expressão relativa (n = 9 indivíduos, em triplicata para PBM; n = 5 experimentos, em triplicata para THP-1). * para ANOVA, $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

4.3.1 Indução da Expressão Gênica de *CYBA* e *NCF2* pelo BAY 41-2272

Após o tratamento com BAY 41-2272, por 48 horas, tendo o IFN- γ como controle, observamos um aumento significativo na expressão dos genes *CYBA* e *NCF2* nos monócitos e células THP-1 (**Figuras 10**). O gene *NCF1*, codificador da proteína p47^{PHOX}, não teve sua expressão aumentada pelas doses do fármaco utilizadas em nenhum dos modelos celulares.

Figura 10 - BAY 41-2272 aumenta a expressão do gene *CYBA* e *NCF2*, mas não *NCF1* em células THP-1 e PBM



4.3.2 Aumento da Expressão Protéica de p67^{PHOX} e gp91^{PHOX}

A expressão gênica dos componentes da NADPH oxidase demonstra que a via de sinalização induzida pelo BAY 41-2272 culmina com a ativação de fatores de transcrição importantes para esses genes. No entanto, biologicamente, o aumento da expressão gênica por si só não indica um maior aporte das proteínas no citoplasma e/ou membrana das células. Portanto, após o tratamento com BAY 41-2272, avaliamos também a expressão protéica dos componentes da NADPH oxidase. Pudemos constatar que o fármaco aumentou a expressão da p67^{PHOX} (**Figura 11**) e gp91^{PHOX} (**Figura 12**) em monócitos e células THP-1 tratadas por 48 horas. Vale ressaltar que o tratamento não foi eficiente em aumentar a expressão protéica da p22^{PHOX}, mesmo tendo aumentado a expressão de seu gene (*CYBA*).

Os PBM (B) e células THP-1 (C) (1×10^7) foram tratadas por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células foram lisadas para obtenção do extrato total citoplasmático e avaliação da expressão de p22^{PHOX}, p47^{PHOX} e p67^{PHOX} por *Western blot*. A análise foi feita por densitometria das bandas (A) e geração de dados de intensidade de pixels. Os resultados representam a média \pm s.e.m da expressão relativa (n = 9 indivíduos, em triplicata para PBM; n = 5 experimentos, em triplicata para THP-1). * para ANOVA, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE).

Figura 11 - BAY 41-2272 aumenta a expressão protéica de p67^{PHOX}, mas não de p22^{PHOX} e p47^{PHOX}

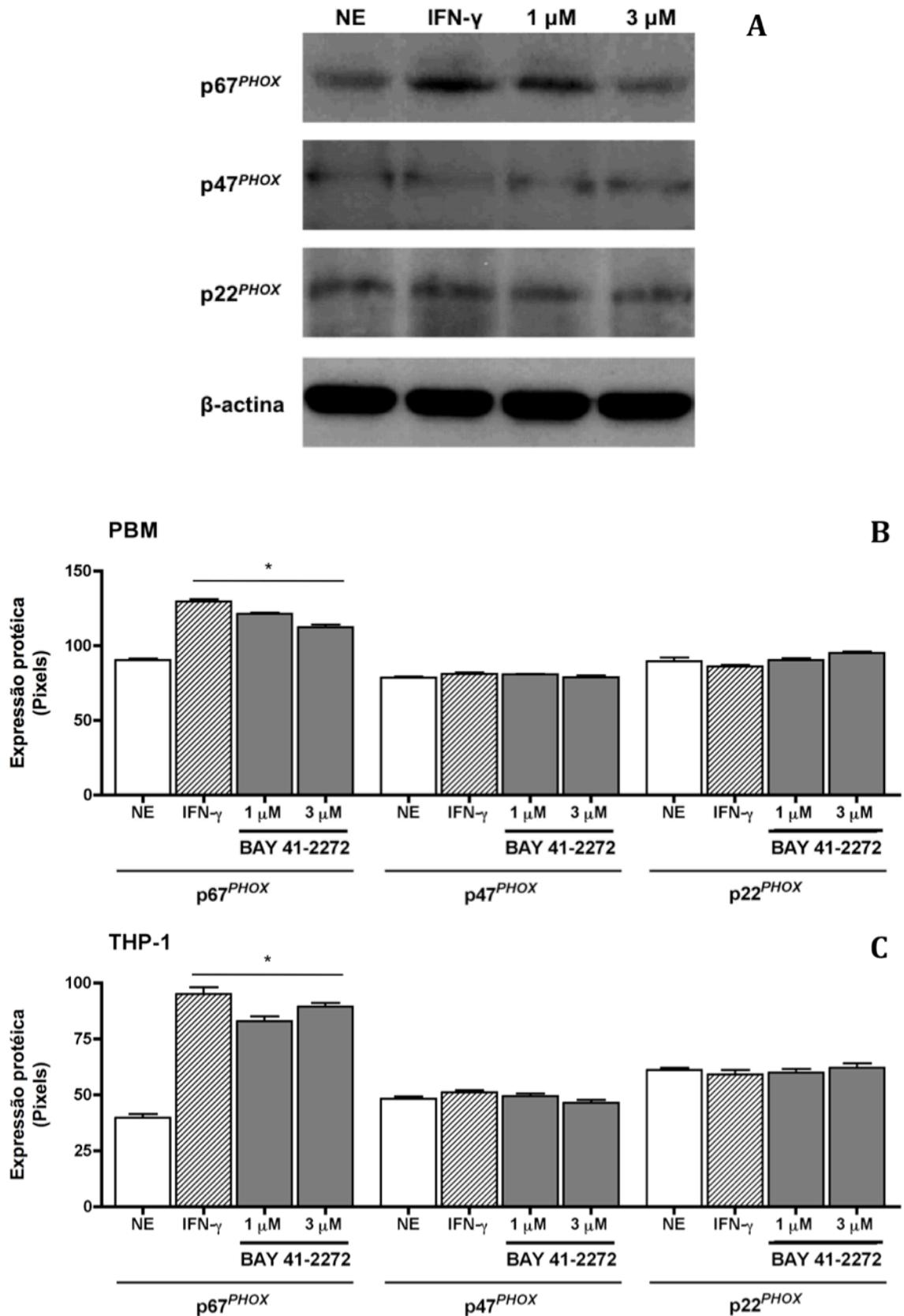
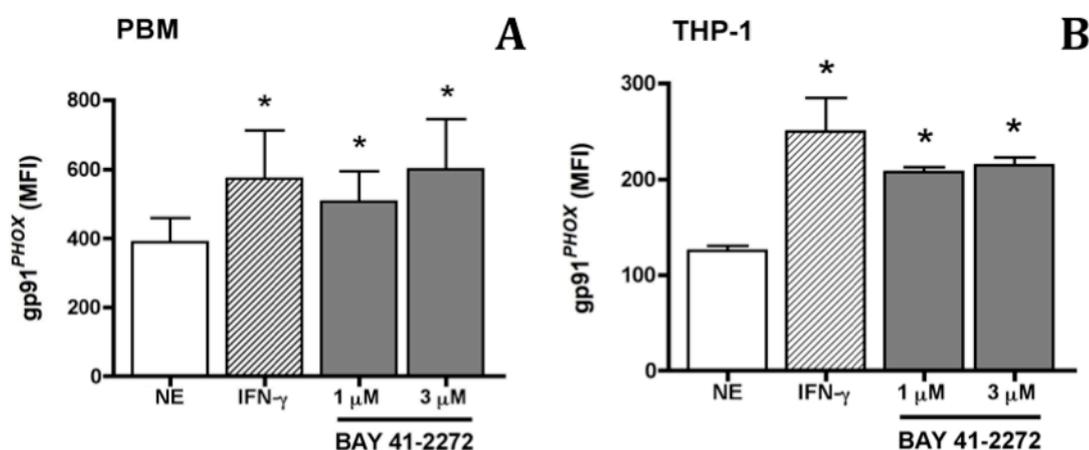


Figura 12 - BAY 41-2272 aumenta a expressão protéica de gp91^{PHOX}



Os PBM (A) e células THP-1 (B) (1×10^6) foram tratadas por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células foram marcadas para avaliação da expressão de gp91^{PHOX} por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média da intensidade de fluorescência (MFI) \pm s.e.m, (n = 5 experimentos, em triplicata). * para ANOVA, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE).

4.4 Ativação da via do NF- κ B pelo Tratamento com BAY 41-2272

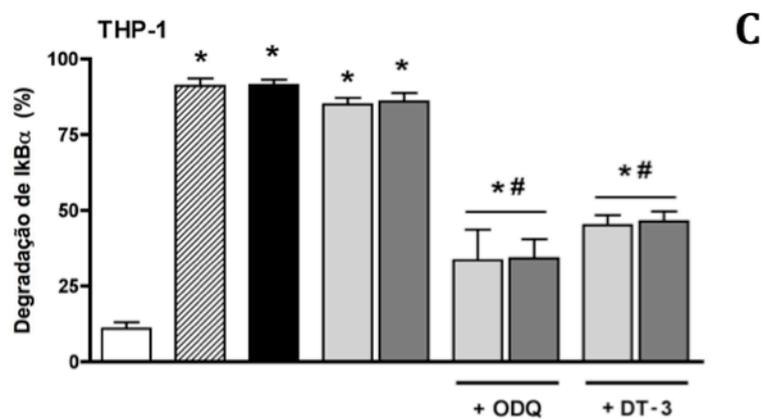
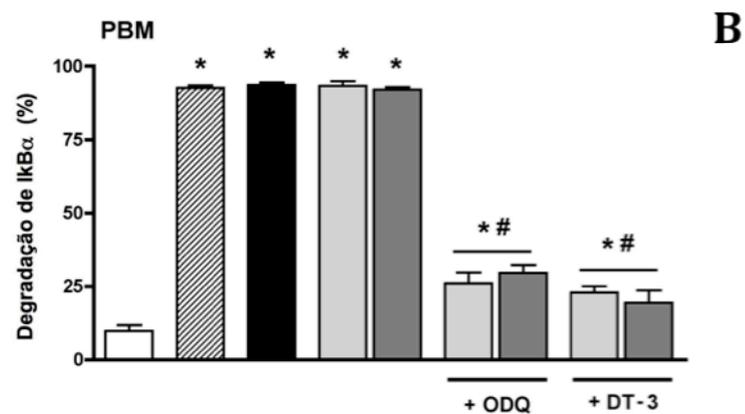
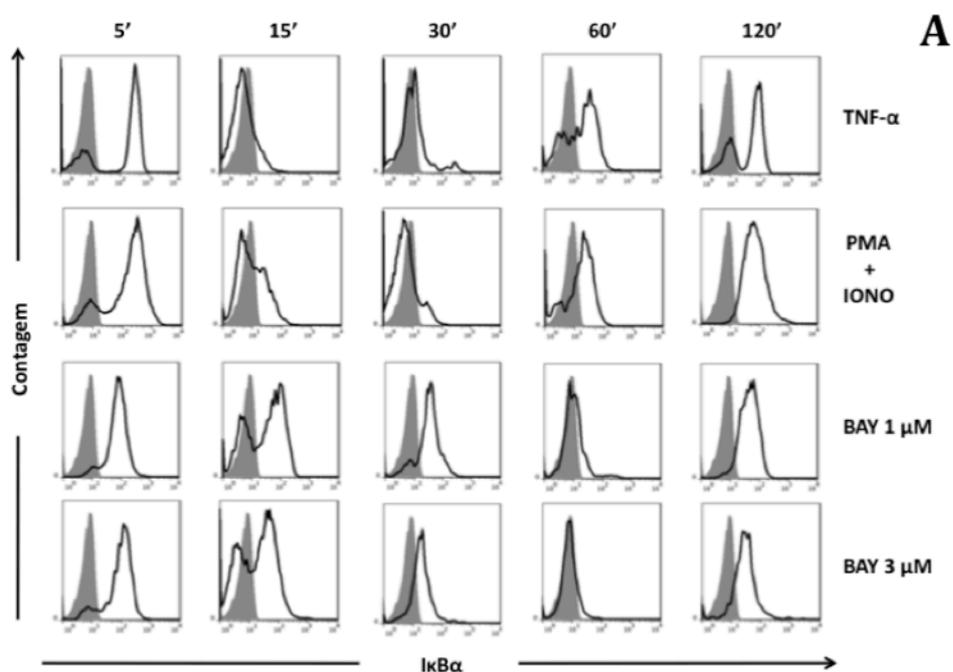
O tratamento com o BAY 41-2272 acentuou a produção de citocinas importantes para modulação dos monócitos, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , assim como a expressão dos genes *CYBB* e *NCF2*. Esses componentes tem em comum a dependência, mesmo que não exclusiva, do acionamento do fator de transcrição NF- κ B. Desse modo, avaliamos se o BAY 41-2272 ativa essa via importante.

4.4.1 Pré-tratamento com BAY 41-2272 Promove a Degradação de I κ B α e Fosforilação de NF- κ B de Forma Dependente de PKG

Para essa avaliação, os monócitos de sangue e células THP-1 foram estimulados com BAY 41-2272 por tempos distintos (5, 15, 30, 60 e 120 minutos) e tiveram a degradação de I κ B α e fosforilação de NF- κ B avaliadas por citometria de fluxo. O tratamento com BAY 41-2272 induziu a degradação de I κ B α (**Figura 13**) e fosforilação de NF- κ B (**Figura 14**) de forma significativa. Ainda, mostramos – com uso de inibidores químicos – que essa ativação do NF- κ B pelo BAY 41-2272 depende da Guanilato Ciclase solúvel e da proteína quinase G, principal quinase da sua cascata de sinalização.

Os PBM (B) e células THP-1 (C) (1×10^6) foram tratados por 5, 15, 30, 60 e 120 minutos com TNF- α (1000 U/mL) ou PMA (30 nM) associado a ionomicina (0,5 μ M) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células foram permeabilizadas e marcadas para avaliação da expressão de I κ B α por citometria de fluxo (A). Para melhor análise foi feito um índice usando a MIF da expressão inicial da proteína e de sua máxima degradação, para cada tratamento. Os resultados expressam a porcentagem de degradação do I κ B α \pm s.e.m, (n = 7 indivíduos, em triplicata para PBM; n = 5 experimentos, em triplicata para THP-1). * para ANOVA, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE); # para ANOVA, p < 0,05 em relação ao mesmo grupo não tratado com os inibidores. ODQ: inibidor de Guanilato Ciclase solúvel; DT-3: inibidor de PKG.

Figura 13 - Tratamento com BAY 41-2272 induz a degradação de I κ B α em monócitos e células THP-1

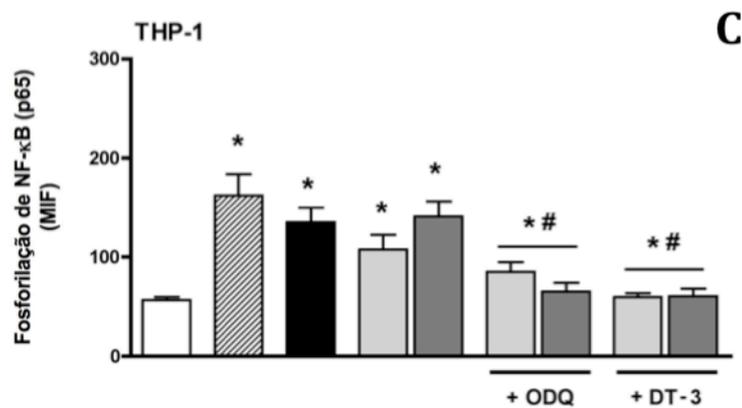
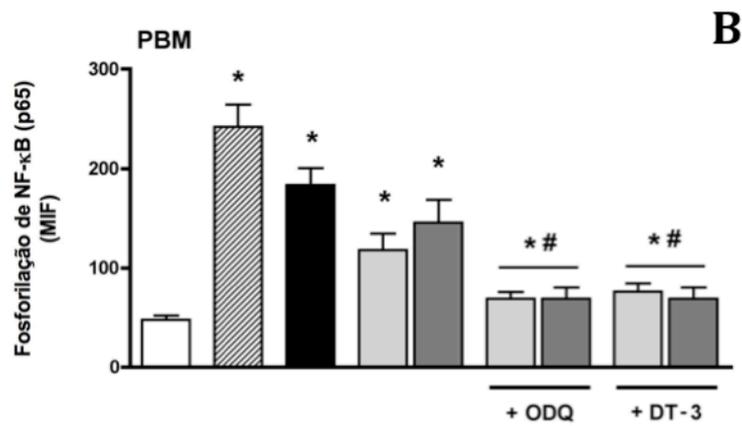
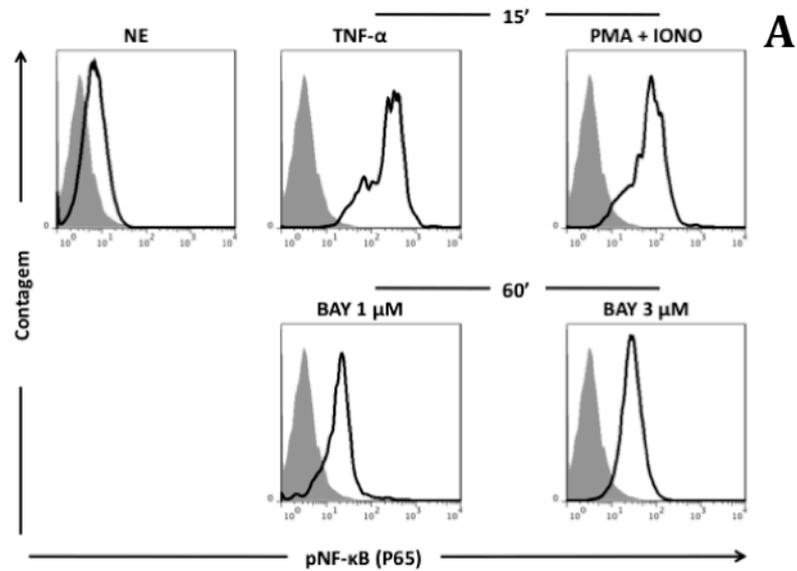


Não estimulado
 PMA + Ionomicina
 BAY 3 μ M

TNF- α (1000 U/mL)
 BAY 1 μ M

Os PBM (B) e células THP-1 (C) (1×10^6) foram tratados por 5, 15, 30, 60 e 120 minutos com TNF- α (1000 U/mL) ou PMA (30 nM) associado a ionomicina (0,5 μ M) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células foram permeabilizadas e marcadas para avaliação da expressão de NF- κ B (p65) fosforilado (pS529) por citometria de fluxo (A). Os resultados expressam média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm s.e.m, (n = 7 indivíduos, em triplicata para PBM; n = 5 experimentos, em triplicata para THP-1). * para ANOVA, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE); # para ANOVA, p < 0,05 em relação ao mesmo grupo não tratado com os inibidores. ODQ: inibidor de Guanilato Ciclase solúvel; DT-3: inibidor de PKG.

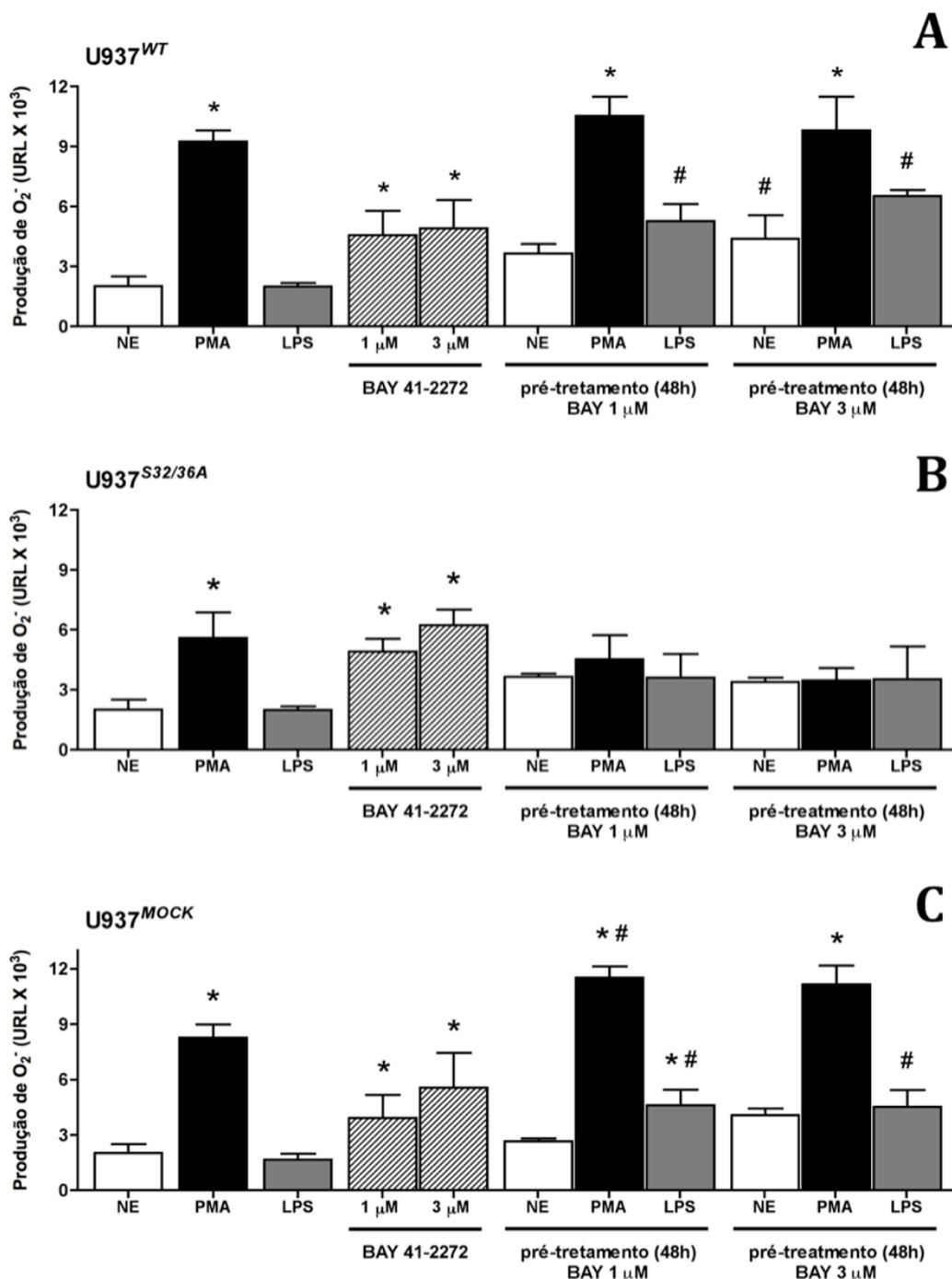
Figura 14 - Tratamento com BAY 41-2272 induz a fosforilação de NF- κ B em monócitos e células THP-1



4.4.2 Pré-tratamento com BAY 41-2272 Induz a Ativação do Sistema NADPH Oxidase de Forma Dependente de NF- κ B

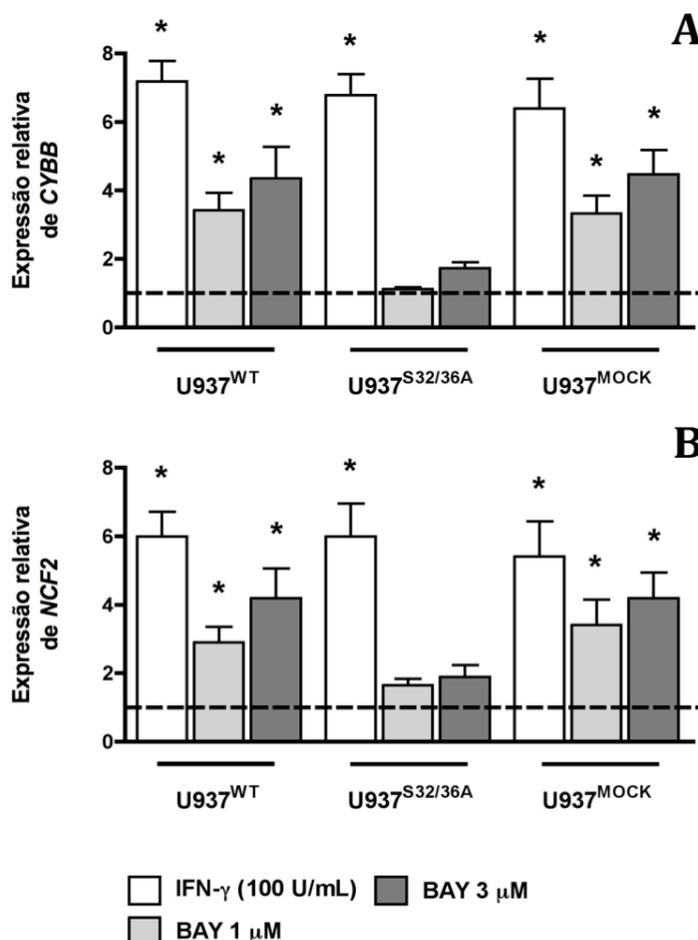
Uma vez que verificamos a indução da via do NF- κ B pelo BAY 41-2271, avaliamos o efeito do fármaco sobre a produção de ânion superóxido (O_2^-) e expressão dos genes *CYBB* e *NCF2* em células pró-monocíticas U937 *knockdown* (U937^{S32/36A}) para o fator de transcrição em questão. As células U937^{S32/36A} responderam ao tratamento com o BAY 41-2272 por duas horas (**Figura 15 B**), produzindo significativamente mais O_2^- que o controle não estimulado. No entanto, o tratamento por 48 horas com o fármaco não induziu a expressão de *CYBB* e *NCF2* (**Figura 16**), ou mesmo a pré-ativação em relação à produção de O_2^- nas células U937^{S32/36A} (**Figura 15**).

Figura 15 - BAY 41-2272 ativa NF- κ B, pré-estimulando o sistema NADPH oxidase em células U937



As células U937 selvagens (WT), transfectadas com I κ B α mutante (S32/36A) ou com vetor vazio (*mock*) (2×10^6) foram tratadas por duas horas com PMA (30 nM), LPS (30 ng/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). As células também foram pré-estimuladas com BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M) por 48 horas, sendo posteriormente ativadas com PMA (30 nM) ou LPS (30 ng/mL). Após os tratamentos, as células foram incubadas com lucigenina (1 mM) para avaliação da produção de ânion superóxido (O₂⁻) por quimioluminescência. Os resultados expressam unidade relativa de luz (URL) média \pm s.e.m, (n = 5 experimentos, em triplicata). * para ANOVA, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE); # para ANOVA, p < 0,05 em relação ao mesmo grupo sem pré-tretamento com BAY 41-2272.

Figura 16 - BAY 41-2272 induz a expressão de *CYBB* e *NCF2* via NF- κ B



As células U937 selvagens (WT), transfectadas com I κ B α mutante (S32/36A) ou com vetor vazio (*mock*) (1×10^7) foram tratadas por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células foram lisadas para obtenção do RNA mensageiro e avaliação da expressão de *CYBB* (A) e *NCF2* (B) por PCR em tempo real. Os resultados representam a média \pm s.e.m da expressão relativa ($n = 5$ experimentos, em triplicata). * para ANOVA, $p < 0,05$ em relação à expressão basal (linha tracejada).

4.5 BAY 41-2272 Acentua a Resposta Microbicida de Monócitos de Pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC) e Deficiência de Mieloperoxidase (MPO)

Uma vez que confirmamos a ação do BAY 41-2272 sobre os fagócitos mononucleares, gerando significativa diferenciação dessas células e potencializando suas respostas efetoras, testamos os efeitos do fármaco sobre monócitos de pacientes com imunodeficiências primárias – DGC e deficiência de MPO.

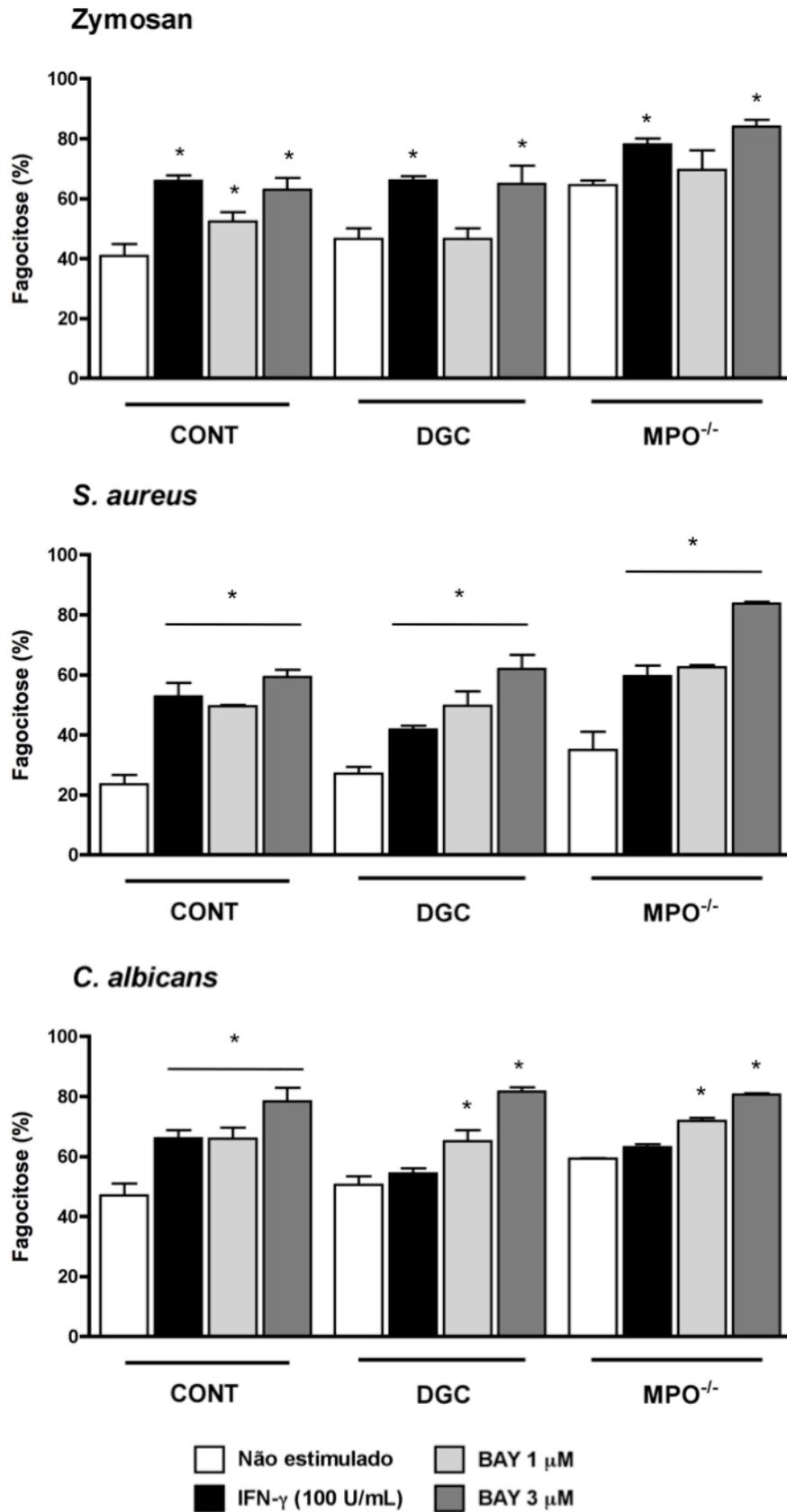
Primeiramente avaliamos a atividade fagocítica dos monócitos desses pacientes tratadas ou não com BAY 41-2272 por 48 horas. Nenhum dos pacientes mostrou, espontaneamente, deficiência na fagocitose e o tratamento com o fármaco aumentou essa resposta em todos os grupos, pacientes e controles saudios (**Figura 17**).

Avaliamos também a ação do BAY 41-2272 sobre a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio pelos monócitos desses pacientes. O tratamento com o fármaco, por 48 horas, pré-ativou os monócitos dos indivíduos saudios e dos pacientes com deficiência de MPO, aumentando a produção de O_2^- e H_2O_2 quando estimulados com PMA, *S. aureus* ou *C. albicans*. No entanto, não surtiu efeito sobre os monócitos de pacientes com DGC, uma vez que esses possuem uma mutação que impede a expressão do gene da $gp91^{PHOX}$ (**Figura 18 e 19**).

Ainda, os monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO, tratados com BAY 41-2227 por 48 horas, foram incubados com *S. aureus* ou *C. albicans* para avaliação da atividade microbicida. O tratamento com o fármaco potencializou significativamente o *killing* dos patógenos pelos monócitos de todos os indivíduos, saudios e imunodeficientes (**Figura 20**). É importante ressaltar que, mesmo sem aumentar a produção de reativos de oxigênio nos monócitos *knockout* para $gp91^{PHOX}$ (DGC), o tratamento com BAY 41-2272 potencializou a atividade microbicida das células.

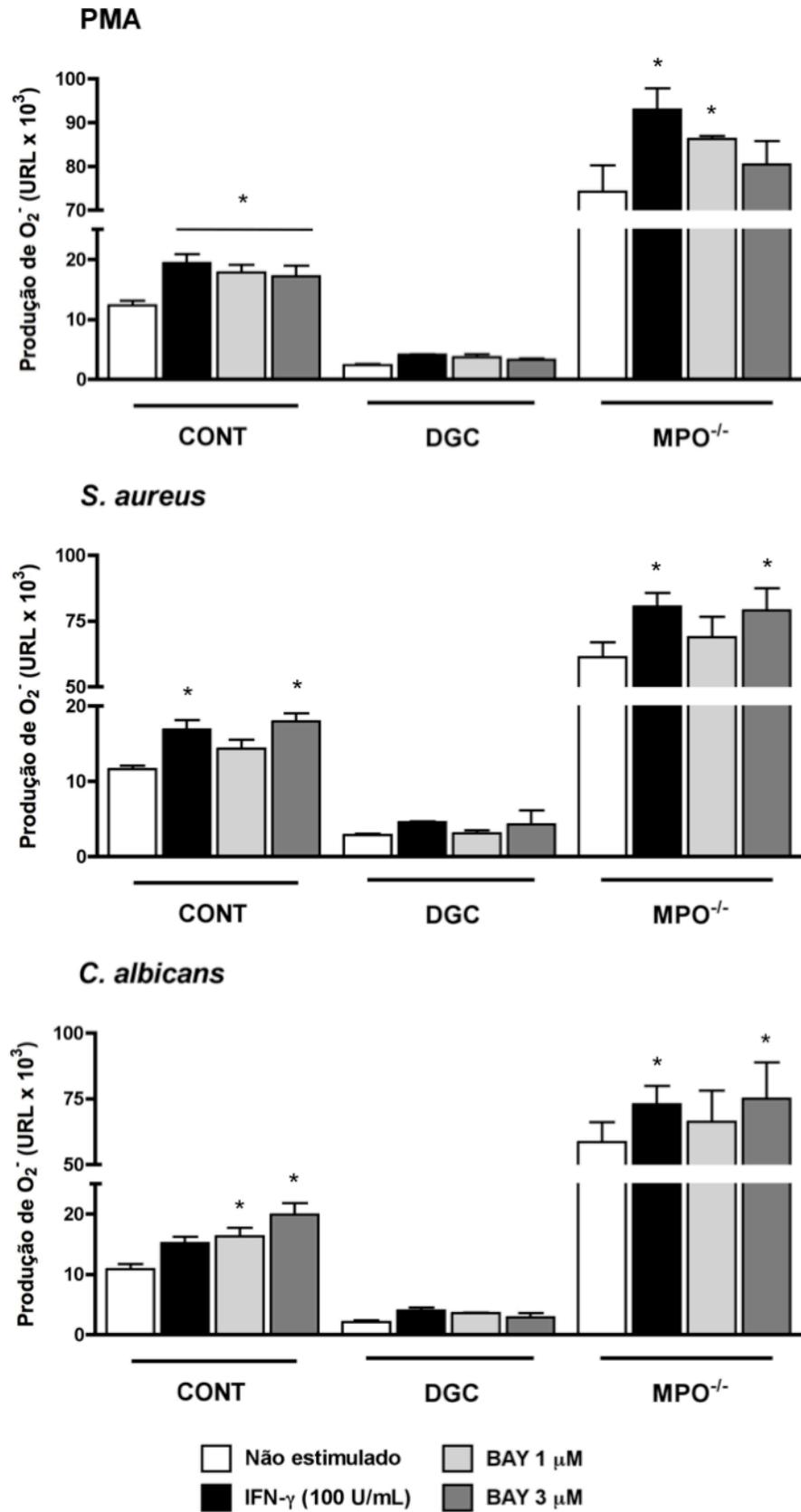
Os PBM dos pacientes e controles sadios ($0,5-1 \times 10^6$) foram tratados por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células incubadas por uma hora com Zymosan (10 partículas : 1 fagócito), ou *S. aureus* (10 bactérias : 1 fagócito), ou *C. albicans* (1 levedura : 2 fagócitos) marcados com FITC para avaliação da fagocitose por citometria de fluxo. Os resultados expressam a porcentagem média de fagocitose \pm s.e.m, (n = 9 indivíduos sadios, 2 pacientes com DGC, 2 pacientes com deficiência de MPO, em triplicata). * para Teste de Fisher, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE).

Figura 17 - BAY 41-2272 potencializa a atividade fagocítica de PBM de pacientes com DGC e deficiência de MPO



Os PBM dos pacientes e controles sadios (1×10^6) foram tratados por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após os tratamentos, as células incubadas por duas horas com Zymosan (10 partículas : 1 fagócito), ou *S. aureus* (10 bactérias : 1 fagócito), ou *C. albicans* (1 levedura : 2 fagócitos), na presença de lucigenina (1 mM), para avaliação da produção de ânion superóxido (O_2^-) por quimioluminescência. Os resultados expressam unidade relativa de luz (URL) média \pm s.e.m, (n = 9 indivíduos sadios, 2 pacientes com DGC, 2 pacientes com deficiência de MPO, em triplicata). * para Teste de Fisher, $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

Figura 18 - BAY 41-2272 aumenta a produção de O_2^- por PBM de pacientes com deficiência de MPO



Os PBM dos pacientes e controles sadios (1×10^6) foram tratados por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após os tratamentos, as células incubadas por uma duas horas com Zymosan (10 partículas : 1 fagócito), ou *S. aureus* (10 bactérias : 1 fagócito), ou *C. albicans* (1 levedura : 2 fagócitos), na presença de luminol (1 mM), para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por quimioluminescência. Os resultados expressam unidade relativa de luz (URL) média \pm s.e.m, (n = 9 indivíduos sadios, 2 pacientes com DGC, 2 pacientes com deficiência de MPO, em triplicata). * para Teste de Fisher, $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

Figura 19 - BAY 41-2272 aumenta a produção de H₂O₂ por PBM de pacientes com deficiência de MPO

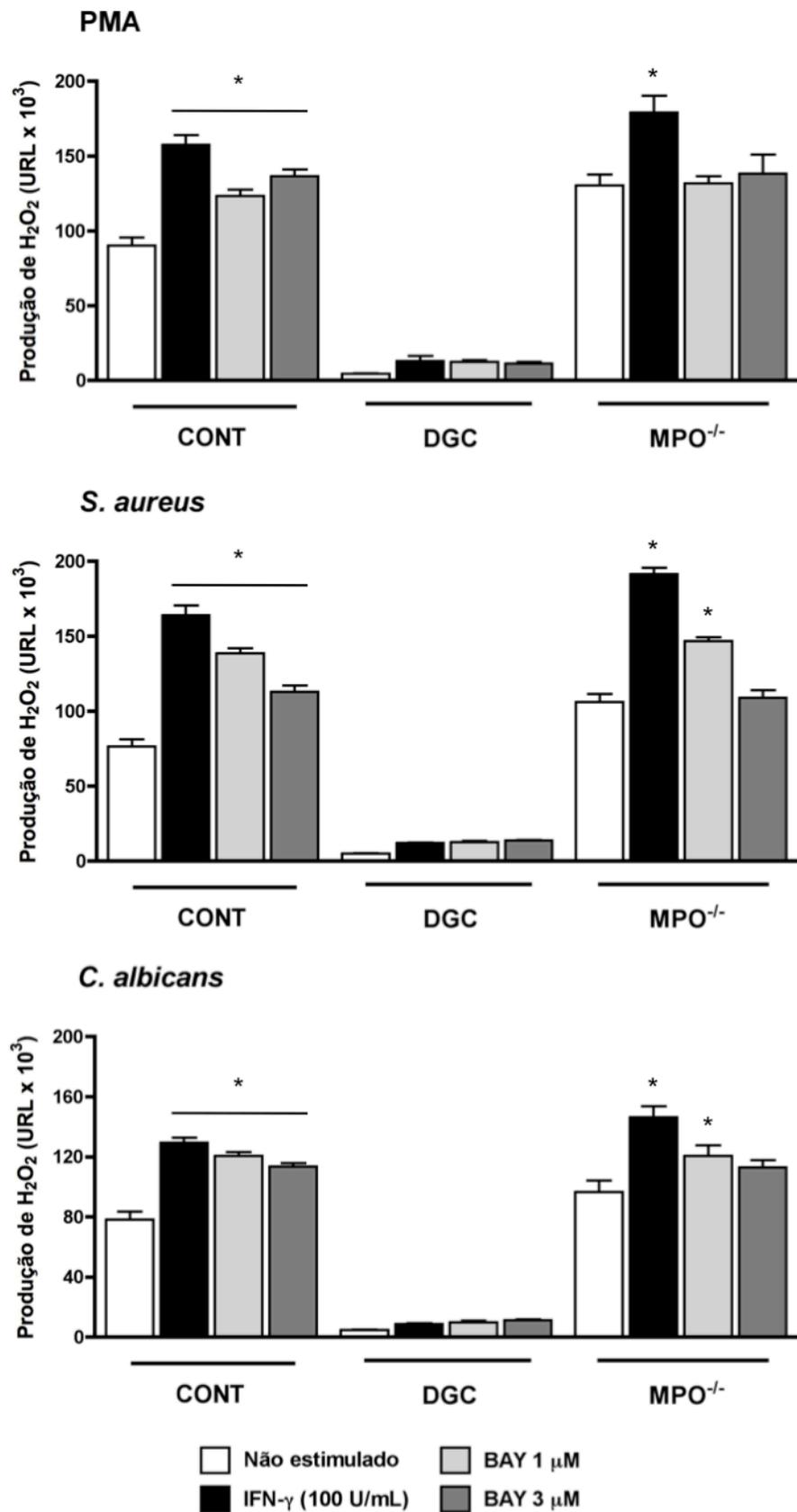
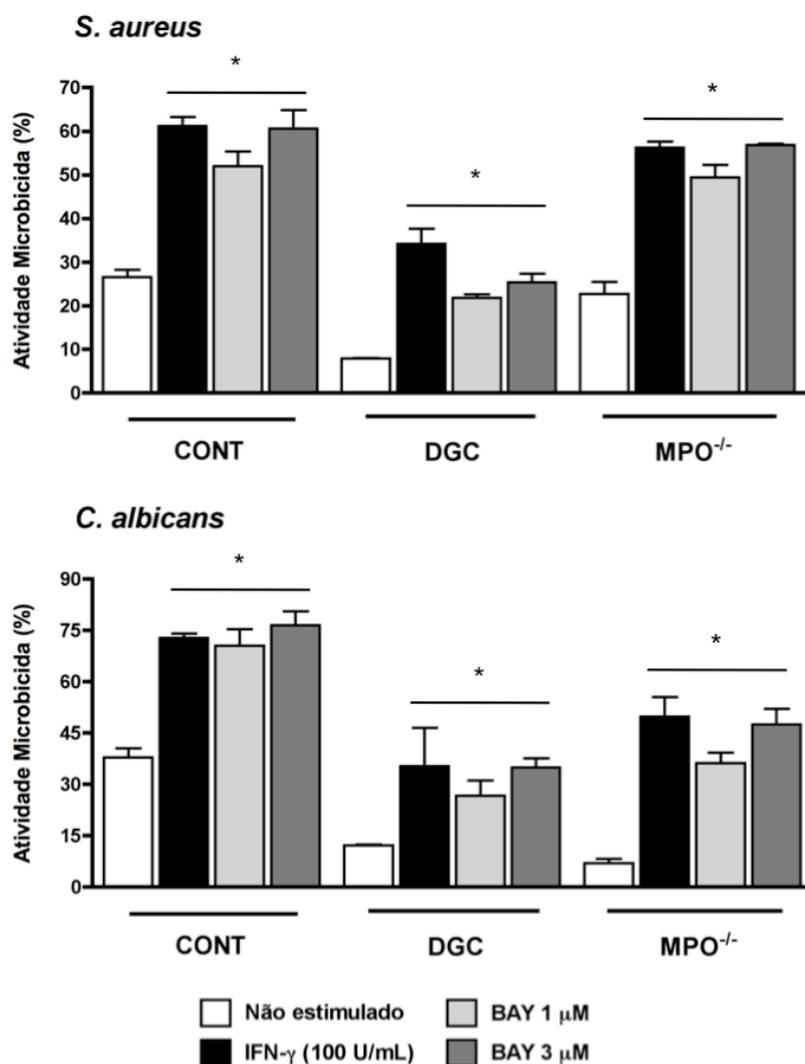


Figura 20 - BAY 41-2272 potencializa a atividade microbicida de PBM de pacientes com DGC e deficiência de MPO



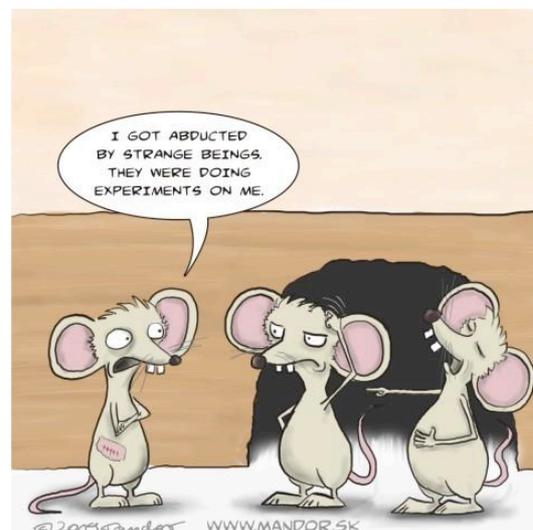
Os PBM dos pacientes e controles saudios (1×10^6) foram tratados por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após os tratamentos, as células cultivadas por uma duas horas com *S. aureus* (10 bactérias : 1 fagócito), ou *C. albicans* (1 levedura : 2 fagócitos) para avaliação da atividade microbicida por recuperação dos patógenos e incubação com MTT (0,5 mg/mL). Os resultados expressam porcentagem de atividade microbicida média \pm s.e.m, (n = 9 indivíduos saudios, 2 pacientes com DGC, 2 pacientes com deficiência de MPO, em triplicata). * para Teste de Fisher, p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE).

4.6 Sumário dos Resultados

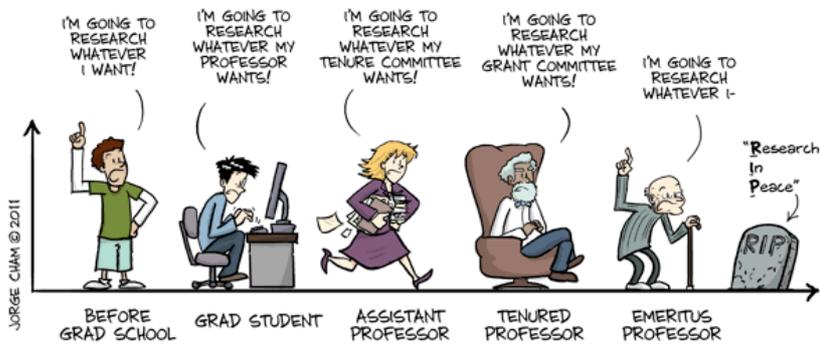
O tratamento de fagócitos mononucleares humanos (linhagens mielomonocíticas THP-1, U937 – selvagens e *knockdown* para NF- κ B – e monócitos de sangue periférico) com o BAY 41-2272:

- induziu a expressão de moléculas importantes para resposta destas células, como CD11b, CD18, CD14, TLR4, TLR2 e CD163;
- aumentou da produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12p70;
- ativou o sistema NADPH oxidase, aumentando a expressão gênica (*CYBB*, *CYBA* e *NCF2*) e protéica (p67^{PHOX} e gp91^{PHOX}) dos seus componentes;
- induziu a degradação de I κ B α e a fosforilação de NF- κ B (p65);
- aumentou a atividade microbicida a *S. aureus* e *C. albicans* de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica e Deficiência de Mieloperoxidase.

CAPÍTULO 2 - EFEITO *IN VIVO* DO TRATAMENTO COM BAY 41-2272



THE EVOLUTION OF INTELLECTUAL FREEDOM



WWW.PHDCOMICS.COM

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do BAY 41-2272 em ativar a resposta imune a infecções em modelo murino.

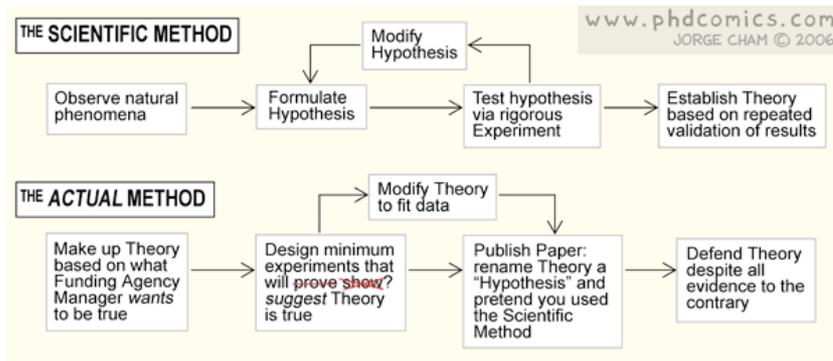
5.2 Objetivos Específicos

5.2.1 Avaliar em Camundongos C3H/HePas, Tratados Intraperitonealmente (i.p.) com BAY 41-2272 ou Concanavalina A:

- a) indução de migração celular pela determinação do número de células do peritônio, baço, linfonodo mesentérico e medula óssea;
- b) resposta inflamatória induzida por carragenina;
- c) sobrevida à infecção sistêmica (intraperitoneal) por *C. albicans* e *S. aureus*;
- d) resposta à infecção local (subcutânea) por *C. albicans* e *S. aureus*.

5.2.2 Avaliar em Macrófagos Peritoneais de Camundongos C3H/HePas, Tratados i.p. com BAY 41-2272 ou Concanavalina A:

- a) capacidade de espraiamento e atividade fagocítica;
- b) produção de peróxido de hidrogênio;
- c) liberação de óxido nítrico;
- d) atividade microbicida contra *C. albicans* e *S. aureus*, sendo adicionado a esta avaliação o estímulo *in vitro* de macrófagos residentes com os mesmos tratamentos.

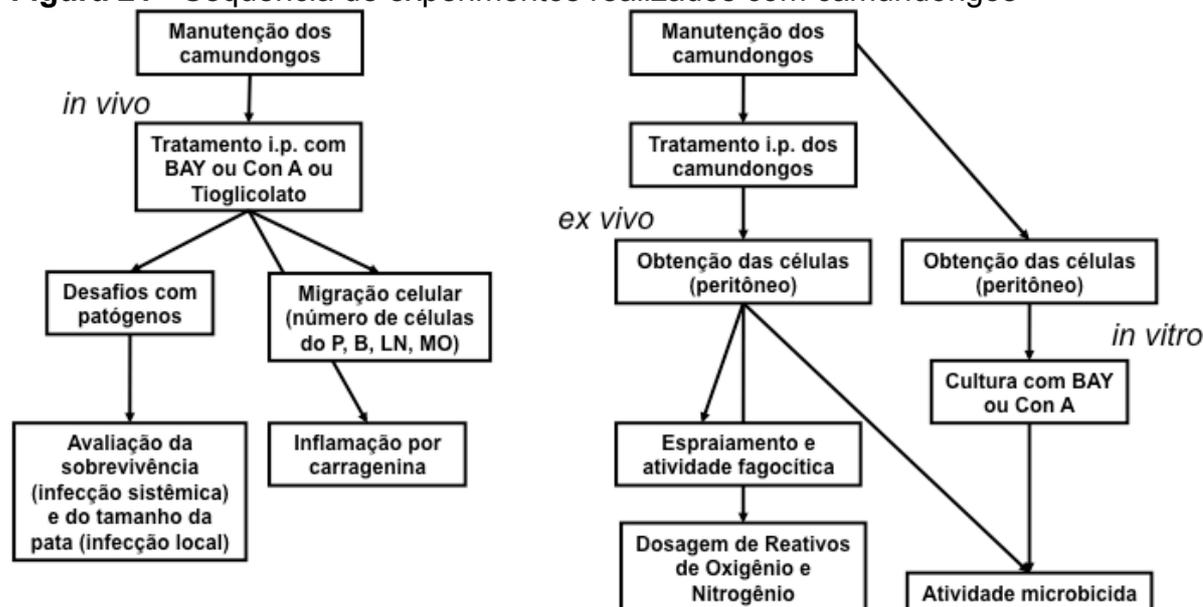


6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Algoritmo da Metodologia – Modelo Animal

Os algoritmos da figura abaixo trazem os procedimentos realizados em modelo murino, em ordem, para melhor entendimento.

Figura 21 - Sequência de experimentos realizados com camundongos



P: peritônio; B: baço; LN: linfonodo; MO: medula óssea; Con A: concanavalina A; i.p.: intraperitoneal.

6.2 Animais

O estudo foi realizado em camundongos machos isogênicos da linhagem C3H/HePas (5/grupo), pesando entre 20 e 25 gramas (8-12 semanas). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (20-22°C), sob ciclos claro/escuro de 12/12 horas, no Biotério de Experimentação do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha peneirada e autoclavada, recebendo ração balanceada, e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos descritos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) (N° 136, folhas 110, livro 02).

6.3 Tratamentos Farmacológicos

Para o tratamento dos animais, necessitamos diluir o fármaco em uma solução diferente do DMSO, tóxico para o organismo. Desse modo, o BAY 41-2272 foi diluído em solução de transcutool (Sigma-Aldrich), cremofor-EL (Sigma-Aldrich) e água (proporção de 10:20:70, vol:vol:vol) numa concentração final de um mg/mL como descrito anteriormente (Bischoff et al., 2003). Os animais foram então pesados para ajuste das doses do fármaco, também escolhidas com base no trabalho de Bischoff et al. (2003), e de outros reagentes administrados. Os estímulos utilizados, suas respectivas concentrações e breve descrição encontram-se no quadro abaixo. Os tempos dos tratamentos e/ou estímulos usados para realização de protocolo experimental específico foram descritos nos tópicos referentes a esses procedimentos.

Quadro 9 - Estímulos utilizados para tratamento dos animais

(continua)

Estímulo	Concentração final utilizada	Descrição	Fabricante
BAY 41-2272	0,1, 1, 3 ou 10 mg/Kg; 1 ou 3 μ M	Agonista de Guanilato Ciclase solúvel	BAYER
Tioglicolato	4 %	Composto orgânico ativador e quimiotático para leucócitos	Sigma-Aldrich
Concanavalina A (Con A)	0,5 mg/Kg	Lectina de <i>C. ensiformis</i> (quimiotática e ativadora de macrófagos)	Sigma-Aldrich
PMA	30 nM	Ativador de proteína quinase C	Sigma-Aldrich
Carragenina	6 μ g/ μ L	Polissacarídeo indutor de inflamação	Sigma-Aldrich
Penicilina G	5 KU/Kg	Antibiótico beta-lactâmico	Sigma-Aldrich
Tetraciclina	1 mg/Kg	Antibiótico inibidor da síntese protéica	Sigma-Aldrich

Quadro 9 - Estímulos utilizados para tratamento dos animais

(conclusão)

Estímulo	Concentração final utilizada	Descrição	Fabricante
Itraconazol	20 mg/Kg	Antifúngico inibidor da síntese de ergosterol	Sigma-Aldrich
Zymosan A	proporção de 10 partículas : 1 fagócito	Agonista de TLR2 e Dectina-1 (parede celular de <i>S. cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich
<i>Staphylococcus aureus</i>	proporção de 10 bactérias : 1 fagócito	Bactéria gram-positiva responsável por diversos tipos de infecção (p.ex. pneumonia)	ATCC
<i>Candida albicans</i>	proporção de 2 leveduras : 1 fagócito	Fungo causador de infecções oportunistas (forma de levedura)	ATCC
PBS (solução salina tamponada com fosfato)	10 mM	Solução salina tamponada (pH = 7,4) usada como controle	Manufaturada
Transcutol e Cremofor-EL	10 e 20 % em água	Diluyente do fármaco usado como controle	Sigma-Aldrich

6.4 Avaliação da Indução de Migração Celular – Obtenção de Células do Peritônio, Baço, Linfonodo Mesentérico e Medula Óssea

Os animais foram eutanaziados por asfixia em câmara de CO₂, 4, 24 ou 48 horas após os tratamentos intraperitoneais com BAY 41-2272 (0,1, 1, 3 ou 10 mg/Kg), tioglicolato (4 % em PBS) ou concanavalina A (0,5 mg/Kg), sendo as células peritoneais assepticamente coletadas por meio de lavagem da cavidade com 5 mL de PBS (sem cálcio e magnésio) estéril gelado (4 °C). Os macrófagos residentes foram obtidos de animais que não receberam qualquer tratamento. Para a determinação do número total de células, a suspensão foi diluída em cristal violeta (0,05% em ácido acético 30%; Synth) e as células contadas em hemocitômetro, modelo Neubauer (*Bright-line Hemocytometer*, Sigma). Para discriminação do número de macrófagos e

neutrófilos no lavado peritoneal, as células foram coradas com *kit* Instant-Prov (Newprov, Pinhais, PR, Brasil) para contagem diferencial.

Após obtenção do fluido peritoneal, o linfonodo drenante (mesentérico), o baço e o fêmur (pata direita) foram obtidos cirurgicamente. O linfonodo e o baço foram processados por maceração em tamis de porcelana (malha de 125 μ m) em um e 5 mL de PBS, respectivamente. A medula óssea foi extraída por lavagem do canal medular do fêmur com um mL de PBS. Assim como para o lavado peritoneal, a determinação do número total de células foi feita pela diluição/coloração em cristal violeta, seguida de contagem em câmara hemocitométrica.

6.5 Avaliação do Efeito sob Inflamação em Modelos de Edema de Pata Induzido por Carragenina

Os animais tratados ou não por 48 horas via intraperitoneal com BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg) ou concanavalina A (0,5 mg/Kg) tiveram edema induzido pela injeção intra-plantar de carragenina (CGN) na pata posterior direita (6 μ g/ μ L; 300 μ g/pata). O mesmo procedimento foi realizado com injeção de PBS nas patas esquerdas dos animais que estavam no grupo controle. Após a injeção, a espessura das patas foi medida em intervalos de uma, duas, três e quatro horas, usando paquímetro digital (Pantec, São Bernardo do Campo, SP., Brasil). Previamente à administração da carragenina, mensurou-se as espessuras das patas esquerdas, as quais serviram como controle individual. As medições foram realizadas em triplicata e a medida inicial foi subtraída dos valores obtidos ao fim dos tempos avaliados para determinação da taxa de aumento da pata.

6.6 Função dos Macrófagos Peritoneais - Espriamento

O ensaio de espriamento de macrófagos foi realizado de acordo com Rabinovitch et al. (1977). Após o tratamento intraperitoneal dos animais por 48 horas com BAY 41-2272 (0,1, 1, 3 ou 10 mg/Kg) ou concanavalina A (0,5 mg/Kg), os lavados de células peritoneais (2×10^6) foram centrifugados e suspensos em um mL de PBS contendo glicose (5 mM). Para o ensaio de

espraiamento propriamente, 50 μ L da suspensão celular foram dispensados sobre lamínulas de vidro (20 mm x 20 mm) em poços de placas de cultura de 6 poços e incubados por uma hora a 37 °C. Após a incubação, as lamínulas foram cuidadosamente lavadas em PBS, e as células aderidas ao vidro foram fixadas com glutaraldeído (2,5% por 10 minutos; Synth) e analisadas em microscópio de contraste de fase em ampliação de 400 X. Duzentos macrófagos foram contados em campos aleatórios e determinados como células espraiadas (disformes e “opacas”) ou não (arredondados e refringentes). Para expressar os resultados, um índice de macrófagos espraiados (IE) foi calculado da seguinte forma: $IE = (\text{número de macrófagos espraiados} \times 100) / 200$, ou seja, IE representa a porcentagem de macrófagos espraiados.

6.7 Função dos Macrófagos Peritoneais - Fagocitose

O ensaio de fagocitose foi realizado usando o método descrito por Pinello et al. (2006) e modificado por Cruz et al. (2006). Após o tratamento intraperitoneal dos animais por 48 horas com BAY 41-2272 (0,1, 1, 3 ou 10 mg/Kg) ou concanavalina A (0,5 mg/Kg), os lavados de células peritoneais (2×10^6) foram centrifugados e ressuspendidos em um mL de meio RPMI 1640. Assim como o ensaio para espraiamento, as células foram dispensadas sobre lamínulas de vidro (20 mm x 20 mm) em poços de placas de cultura de 6 poços e incubadas a 37 °C por 20 minutos. Após a incubação, os sobrenadantes das culturas foram aspirados e as células não aderentes removidas por lavagem com PBS. Subsequentemente, foi adicionado às culturas um mL de meio RPMI contendo 5 % de soro fetal bovino inativado pelo calor. As culturas foram mantidas a 37 °C por uma hora na presença de partículas de Zymosan (10 partículas : 1 macrófago). As culturas foram então lavadas com PBS gelado (4 °C) para remover as partículas não internalizadas. As células foram fixadas com glutaraldeído (0,5% por 10 minutos) e uma média de 200 macrófagos foi contada usando microscópio de contraste de fase para determinar a porcentagem de fagocitose. Um índice de fagocitose (IF) foi então calculado segundo a seguinte fórmula: $IF = [(\text{número de macrófagos com atividade fagocítica} \times 100) / 200 \text{ células}]$

aderentes], sendo IF representa a porcentagem de macrófagos com pelo menos duas partículas de Zymosan fagocitadas.

6.8 Avaliação *ex vivo* da Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Para avaliar a liberação de H₂O₂, usamos um microensaio de oxidação de vermelho de fenol por peroxidase (Pick, Mizel, 1981). Neste ensaio, as células peritoneais de animais tratados ou não com BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg) ou concanavalina A (0,5 mg/Kg) foram suspensas em um mL de solução de vermelho de fenol (dextrose 5,5 mM, vermelho de fenol 0,56 mM e peroxidase tipo II 8,5 U/mL, em PBS; Sigma-Aldrich). Dessa suspensão celular, 100 µL (2 x 10⁵ células) foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços, e incubadas na presença ou não de PMA (30 nM), por uma hora a 37 °C em atmosfera úmida saturada com 5 % de CO₂. Após a incubação as placas foram centrifugadas (150 x g por 3 minutos) e os sobrenadantes foram coletados e transferidos para nova placa. A reação foi interrompida com 10 µL de hidróxido de sódio (NaOH; 1 N). A absorbância foi determinada a um comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas (Dynatech Laboratories Inc.). A conversão de absorbância para concentração em µM de H₂O₂ foi feita por comparação com uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas (5-40 µM) de H₂O₂ diluído em meio PBS (Pick, Keisary, 1980).

6.9 Avaliação *ex vivo* da Produção de Óxido Nítrico pela Dosagem de Nitritos (NO₂⁻)

Para essa avaliação, as placas contendo as células utilizadas no ensaio de dosagem de H₂O₂ foram lavadas três vezes com PBS e os macrófagos aderentes restantes foram cultivados em 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (10 mM), bicarbonato de sódio (11 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), L-asparagina (23 mM), ácido fólico (1 mM), ácido pirúvico (0,1 mM) e soro fetal bovino (5%) (todos reagentes adquiridos da Sigma-Aldrich), por 48 horas a 37 °C em um ambiente úmido saturado com 5% de CO₂. Após a incubação,

50 µL do sobrenadante foram coletados e incubados com igual volume de reagente de *Griess* (1% sulfanilamida/0.1% dihidroclorato de diamina naftaleno/2.5% H₃PO₄; Sigma-Aldrich) por 10 minutos a 22 °C, para quantificar o acúmulo de nitrito (Li et al., 1998). Após a reação a absorbância foi determinada a um comprimento de onda de 550 nm. A conversão de absorbância para concentração em µM de NO₂⁻ foi realizada pela comparação com uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas (5-60 µM) de nitrito de sódio diluído em meio RPMI.

6.10 Avaliação da Resposta dos Animais Frente à Infecção com *C. albicans* e *S. aureus*

Para avaliar a resposta dos animais tratados com BAY 41-2272 a infecção por *C. albicans* e *S. aureus* usamos dois modelos: 1) inoculando os patógenos na cavidade peritoneal e avaliando a sobrevivência dos animais, também tratados intraperitonealmente; e 2) inoculando os patógenos de forma subcutânea no coxim plantar da pata dos animais, tratado-os via intraperitoneal ou subcutânea (na lesão).

No primeiro modelo, os animais foram inoculados com uma concentração de 0,5 x 10⁶ blastosporos de *C. albicans* ou 5 x 10⁶ CFU de *S. aureus*, de forma intraperitoneal. Após 48 horas do inóculo, para estabelecimento da infecção, os animais foram tratados também intraperitonealmente com BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg) ou itraconazol (20 mg/Kg) ou penicilina G (5 KU/Kg) juntamente com tetraciclina (1 mg/Kg) nos três dias seguintes, uma vez por dia. Avaliamos então a taxa de sobrevivência dos animais por 20 dias a partir do primeiro dia do inóculo, sendo os resultados expressos em porcentagem de sobrevivência dos animais.

No segundo modelo, os animais foram inoculados com as mesmas concentrações de patógenos de forma subcutânea no coxim plantar da pata esquerda (a pata direita representou um controle individual). Após 48 horas do inóculo, para estabelecimento da infecção, os animais foram tratados intraperitonealmente ou intralesionalmente (mesma pata inoculada) com BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg) ou itraconazol (20 mg/Kg) ou penicilina G (5 KU/Kg)

juntamente com tetraciclina (1 mg/Kg) nos três dias seguintes, uma vez por dia. Medimos então a espessura da pata após 7 dias, a contar do dia do inóculo, para avaliar o desenvolvimento da lesão/infecção.

6.11 Avaliação da Atividade Microbicida de Macrófagos Peritoneais Tratados *ex vivo* e *in vitro* – Modelos de *C. albicans* e *S. aureus*

Para avaliar a atividade microbicida, usamos um microensaio de oxidação de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) após a incubação das células com as bactérias ou fungos. Neste ensaio, usamos dois modelos de tratamentos dos macrófagos peritoneais: 1) *in vitro* – células peritoneais residentes submetidas aos estímulos fora do organismo (BAY 41-2272 1 ou 3 μ M ou Con A 2 μ g/mL), para só então serem incubadas com os patógenos; e 2) *ex vivo* – as células foram retiradas de animais tratados (BAY 41-2272 1 ou 3 mg/Kg ou Con A 0,5 mg/Kg), e submetidas à incubação com os patógenos. Após as preparações das células, $2,5 \times 10^5$ destas foram suspensas em 200 μ L de meio RPMI 1640 sem suplementação (sem vermelho de fenol; LGC), e distribuídas em placas de 96 poços. Em seguida, adicionamos os patógenos na proporção de 10:1, no caso do *S. aureus*, e 2:1 para *C. albicans* (patógenos:macrófagos). Essa co-cultura foi incubada por 2 horas a 37 °C. Após a incubação, a placa foi centrifugada e o *pellet* de células foi lavado duas vezes com PBS para retirada dos patógenos não fagocitados. Após as lavagens, adicionamos Triton X-100 (1,5%) por 10 minutos a 22 °C, para lise dos macrófagos e liberação dos patógenos englobados. Lavamos mais duas vezes com PBS para retirada do Triton X-100 e adicionamos então 100 μ L de MTT (0,5 mg/mL), incubando a suspensão de patógenos por mais duas horas a 22 °C e protegida da luz. Após essa incubação, adicionamos 100 μ L de DMSO para liberação do precipitado de formazan (MTT reduzido) no sobrenadante e incubamos por mais 30 minutos para total solubilização. Após a incubação, as placas foram centrifugadas (300 x g por 3 minutos) e os sobrenadantes foram coletados e transferidos para uma nova placa. A absorbância foi determinada a um comprimento de onda de 570 nm em leitor de microplacas

(Dynatech Laboratories Inc.). A conversão de absorvância para porcentagem de morte foi feita pela fórmula:

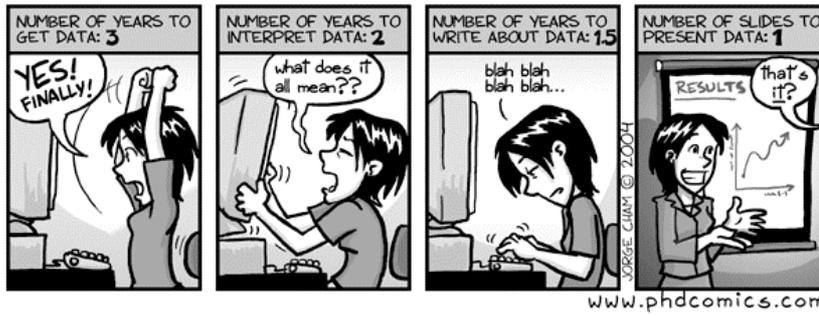
$$1 - \left[\frac{(\text{DO da amostra}) - (\text{DO 90\% killing})}{(\text{DO 10\% killing}) - (\text{DO 90\% killing})} \right] \times 100$$

onde a DO corresponde a densidade óptica (absorvância) adquirida. Esse cálculo baseia-se em uma curva de 100 a 10% das concentrações de patógenos incubadas com os macrófagos peritoneais.

6.12 Análise Estatística

Após a obtenção dos dados brutos (dados numéricos dos parâmetros analisados), procedemos a análise de distribuição destes por teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para os dados com distribuição não Gaussiana, aplicamos o teste não paramétrico de Mann Whitney seguido do teste de Tukey. No caso dos dados com distribuição Gaussiana, aplicamos análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, a probabilidade de $p < 0,05$ capaz de revelar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os dados dos diferentes grupos (da Silva, 2003). Todas as análises foram realizadas no programa *Prism for Mac 4.0* (GraphPad Softawer Inc.).

DATA: BY THE NUMBERS

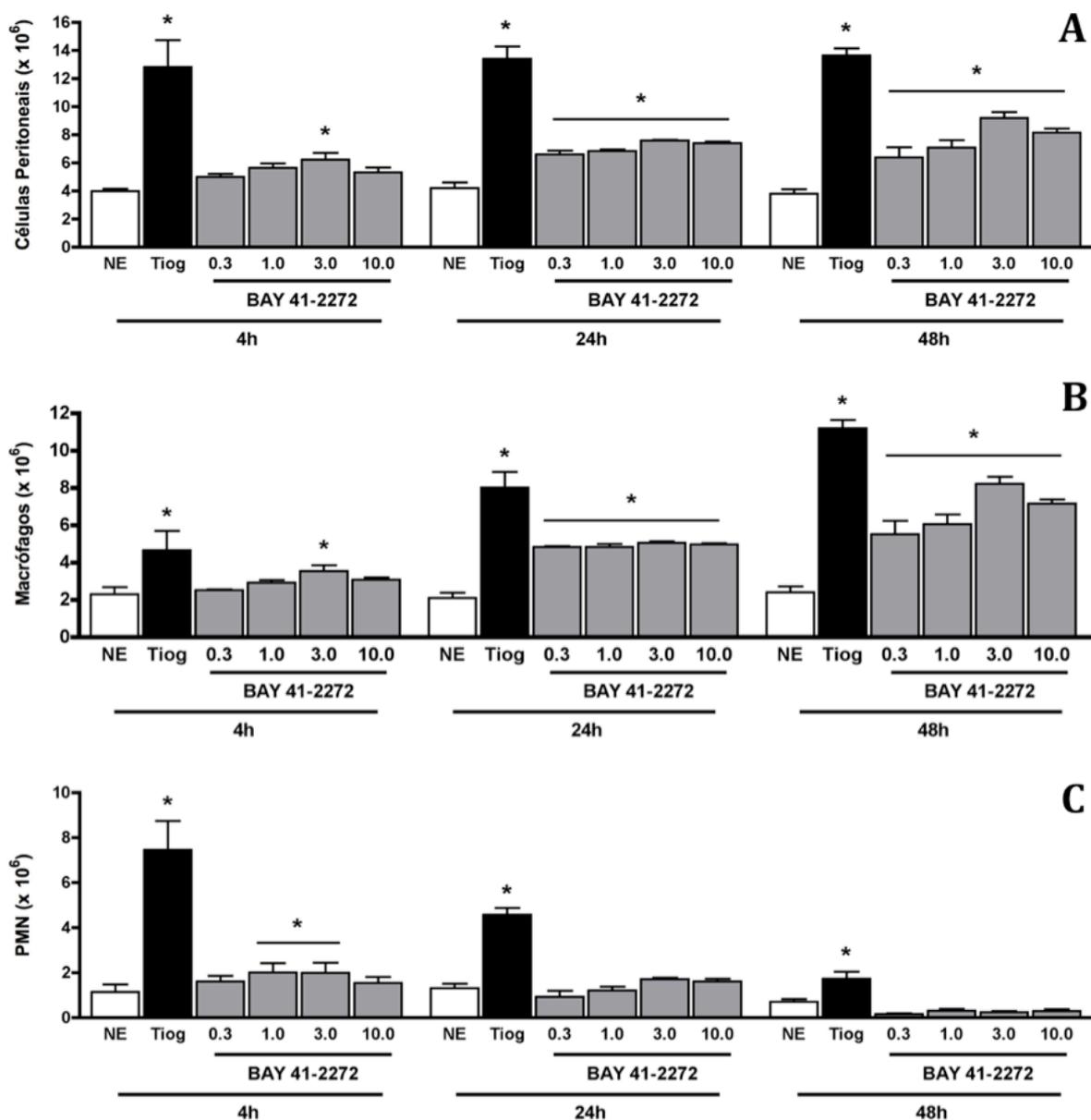


Um dos nossos principais objetivos, juntamente com a elucidação das vias de sinalização ativadas pelo BAY 41-2272 e avaliação dos seus efeitos em células de pacientes imunodeficientes, foi a análise dos seus efeitos em modelo animal. Este modelo constitui uma oportunidade de estudo das ações do fármaco em um sistema complexo e não somente em células isoladas.

7.1 Tratamento com BAY 41-2272 Induz o Influxo Macrófagos para o Peritônio, mas não o Recrutamento Celular para os Órgãos Linfóides

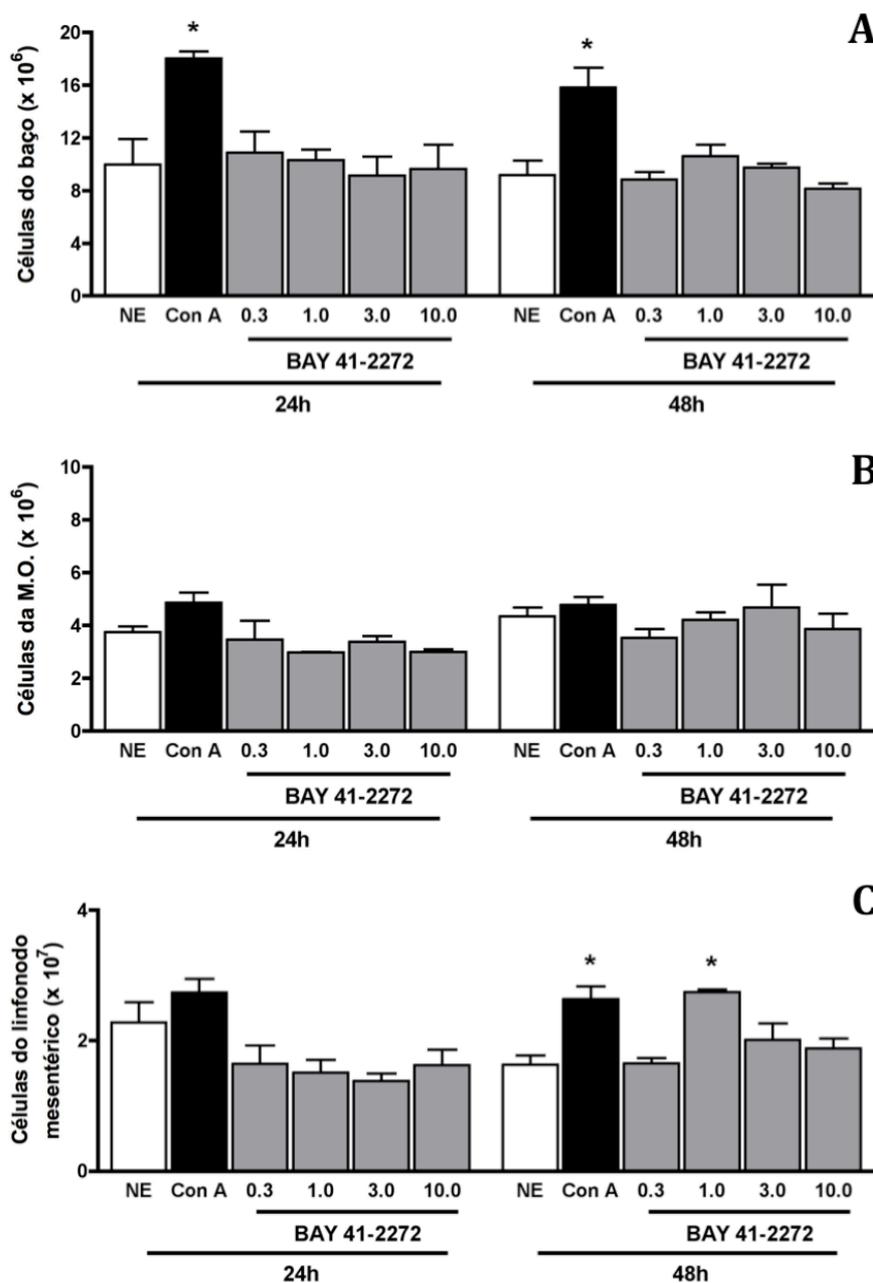
No contexto da distribuição celular, 4, 24 ou 48 horas após o tratamento, o BAY 41-2272 induziu um aumento significativo no número total de células do peritônio quando comparamos com os animais do grupo controle (**Figura 22 A**). Esta população celular estava constituída principalmente por macrófagos (**Figura 22 B**). Esse aumento no influxo celular foi dependente do tempo e da dose do fármaco, sendo as de 1 e 3 mg/Kg mais eficazes. Não observamos diferença no número de células nos demais órgãos linfóides, baço, medula óssea e linfonodo mesentérico, nos animais tratados com BAY 41-2272 (**Figura 23**). Apenas no caso do linfonodo houve uma tendência a um aumento no número de células, evidenciando o processo de recrutamento de células por esse órgão drenante.

Figura 22 - Tratamento intraperitoneal (i.p) com BAY 41-2272 induz o influxo de macrófagos para essa cavidade



Camundongos C3H/HePas foram tratados por via i.p. com tioglicolato (Tiog; 4 %) ou BAY 41-2272 (0,3, 1, 3 ou 10 mg/Kg) por 4, 24 ou 48 horas. Após o tratamento os animais foram eutanaziados para contagem total (A) e diferencial (macrófagos em B; polimorfonucleares em C) das células do lavado peritoneal. Resultados representam média \pm s.e.m. do número de células ($n = 4$ experimentos, em triplicata). * para ANOVA $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

Figura 23 - Tratamento intraperitoneal (i.p.) com BAY 41-2272 não influencia no número de células do baço, medula óssea e linfonodo mesentérico

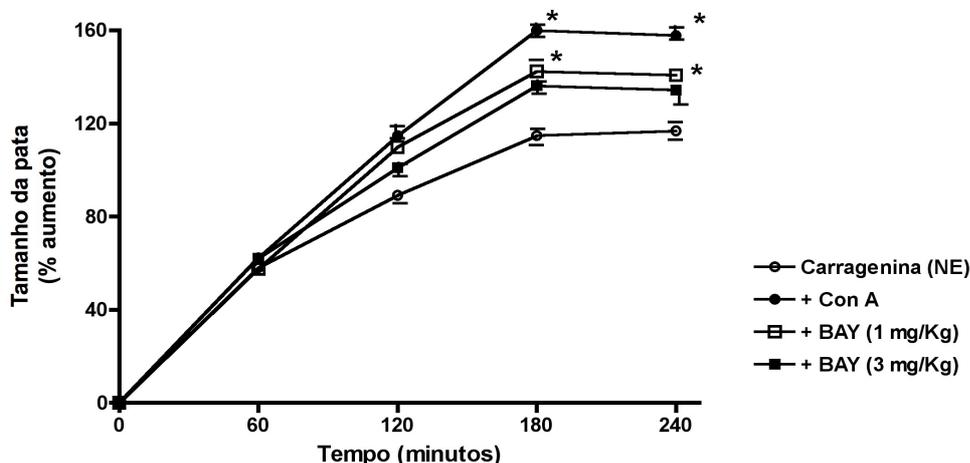


Camundongos C3H/HePas foram tratados por via i.p. com concanavalina A (Con A; 0,5 mg/Kg) ou BAY 41-2272 (0,3, 1, 3 ou 10 mg/Kg) por 24 ou 48 horas. Após o tratamento os animais foram eutanaziados e o baço (A), medula óssea (fêmur) (B), linfonodo mesentérico (C) foram extraídos para contagem total de suas células. Resultados representam média \pm s.e.m. do número de células (n = 4 experimentos, em triplicata). * para ANOVA p < 0,05 em relação ao controle não estimulado (NE).

7.2 Pré-tratamento Intraperitoneal (i.p.) com BAY 41-2272 Aumenta a Inflamação na Pata Induzida por Carragenina

Para estudar a ação do BAY 41-2272 no processo inflamatório, utilizamos o protocolo de edema de pata induzido por carragenina. O tratamento intraperitoneal com BAY 41-2272, assim como o controle com concanavalina A, aumentou o edema provocado pela injeção intraplantar de carragenina (**Figura 24**). Nessa avaliação, a menor dose se mostrou mais eficaz em induzir um processo inflamatório sistêmico.

Figura 24 - Tratamento intraperitoneal com BAY 41-2272 aumenta a atividade inflamatória em modelo de edema de pata induzido por carragenina



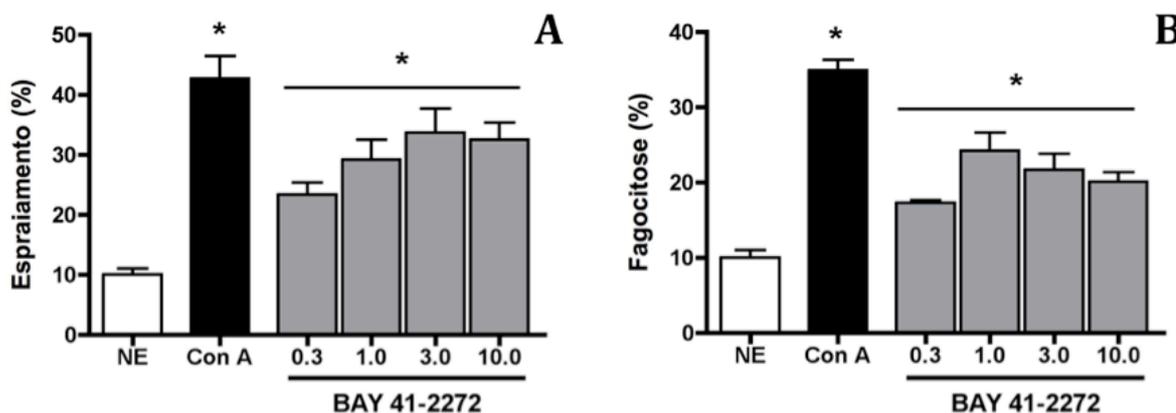
Camundongos C3H/HePas foram tratados por via i.p. com concanavalina A (Con A; 0,5 mg/Kg) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg). Após 48 horas foi injetada carragenina (300 µg/pata) em suas patas esquerdas – conxim plantar – para aferição do edema (tamanho da pata em mm) formado uma, 2, 3 e 4 horas após essa injeção. Resultados representam média ± s.e.m. do índice de aumento no tamanho das patas (n = 4 experimentos, em triplicata). * para ANOVA $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

7.3 BAY 41-2272 Aumenta o Espriamento e Atividade Fagocítica *ex vivo* de Macrófagos Peritoneais

Avaliamos também o espriamento e fagocitose de macrófagos peritoneais de animais tratados com o BAY 41-2272, uma vez que essas são importantes características funcionais dos macrófagos. Os macrófagos dos camundongos tratados com BAY 41-2272 apresentaram um aumento significativo na habilidade de espriamento quando comparados com os controles não tratados (**Figura 25 A**),

resultado que corrobora com ao aumento observado na atividade fagocítica dessas células (**Figura 25 B**).

Figura 25 - Tratamento com BAY 41-2272 pré-ativa os macrófagos peritoneais aumentando o espreiamento e atividade fagocítica

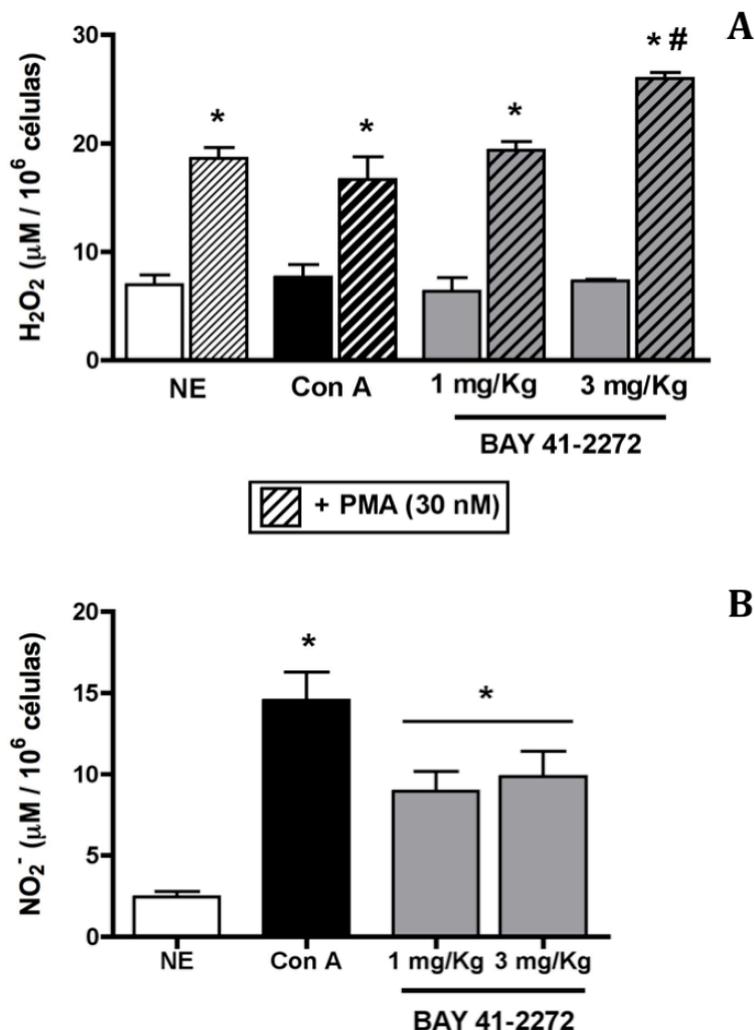


Camundongos C3H/HePas foram tratados por via i.p. com concanavalina A (Con A; 0,5 mg/Kg) ou BAY 41-2272 (0,3, 1, 3 ou 10 mg/Kg). Após 48 horas os animais foram sacrificados e as células (2×10^6) obtidas do lavado peritoneal foram incubadas por 1 hora a 37°C sobre lamínulas de vidro para definir a porcentagem de espreiamento (A) ou co-incubadas com partículas de Zymosan (10 partículas : 1 célula) para definir a porcentagem de fagocitose (B) por microscopia de contraste de fase (aumento 400x). Resultados representam média \pm s.e.m. do índice de espreiamento ou fagocitose ($n = 4$ experimentos, em triplicata). * para ANOVA $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

7.4 Produção de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio pós Tratamento com BAY 41-2272

Sabe-se que a indução da fagocitose está intimamente ligada com a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, portanto avaliamos a produção desses reativos após o tratamento com BAY 41-2272. No nosso estudo, apesar da acentuação da atividade fagocítica, não observamos um aumento na liberação espontânea de peróxido de hidrogênio (**Figura 26 A**) induzida pelo BAY 41-2272. Contudo a propriedade antioxidante do BAY 41-2272 não parece ser permanente, uma vez que a adição de PMA às culturas de macrófagos de camundongos tratados induziu a liberação de altos níveis desse metabólito (**Figura 26 A**). Apesar do BAY 41-2272 não ter induzido a liberação espontânea de H_2O_2 , o tratamento aumentou a produção espontânea de óxido nítrico (**Figura 26 B**).

Figura 26 - BAY 41-2272 aumenta a geração *ex vivo* de H_2O_2 induzida por PMA e a produção espontânea de NO por macrófagos peritoneais



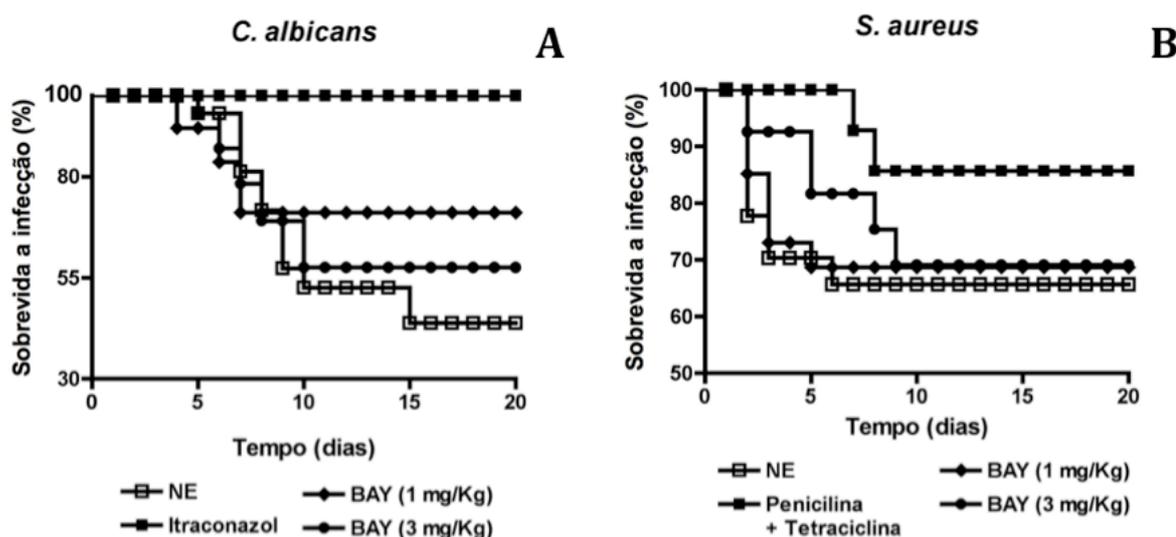
Camundongos C3H/HePas foram tratados por via i.p. com concanavalina A (Con A; 0,5 mg/Kg) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg). Após 48 horas os animais foram sacrificados e as células (2×10^6) obtidas do lavado peritoneal foram estimuladas ou não com PMA (30 nM) por 1 hora, para avaliação da produção de H_2O_2 (A) por ensaio de oxidação de vermelho de fenol. As células peritoneais (2×10^6) também foram avaliadas para a produção de NO_2^- (B) por ensaio colorimétrico de Griess. Resultados representam média \pm s.e.m. das concentrações de H_2O_2 ou NO_2^- ($n = 4$ experimentos, em triplicata). * para ANOVA $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE); # para ANOVA $p < 0,05$ em relação ao grupo NE pós-ativado com PMA.

7.5 Avaliação da Resposta de Camundongos C3H/HePas Tratados com BAY 41-2272 a Desafios com *C. albicans* ou *S. aureus*

De uma forma geral, o tratamento com o BAY 41-2272 por via intraperitoneal de aplicação mostrou-se eficiente em ativar os fagócitos *in vivo*, com seus efeitos estendidos *ex vivo*. Desse modo, testamos o potencial do fármaco em controlar

infecções desafiando os camundongos C3H/HePas com *C. albicans* e *S. aureus*. Nossos resultados mostraram que o tratamento com BAY 41-2272 intraperitonealmente, 48 horas após a infecção, aumentou significativamente a sobrevivência dos animais frente à infecção por *C. albicans* (Figura 27 A). No entanto, o mesmo não foi observado em relação ao *S. aureus* (Figura 27 B).

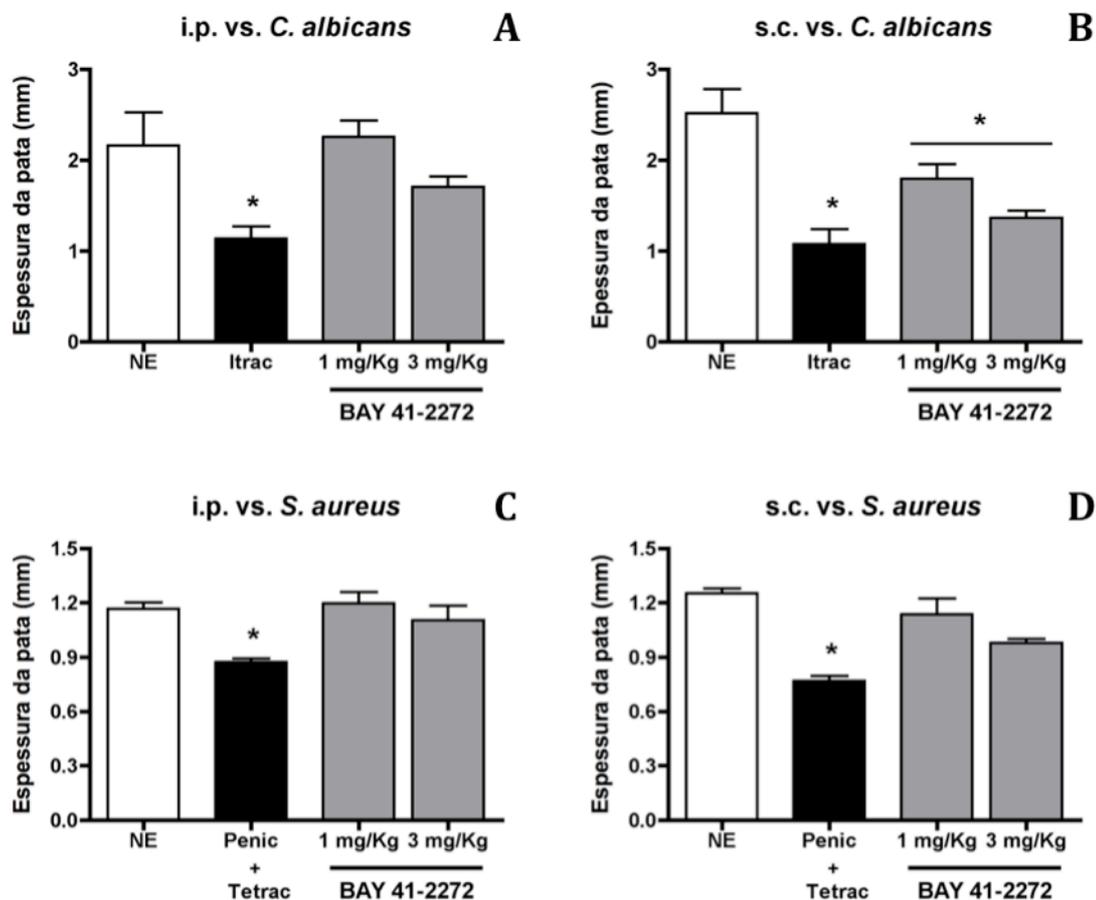
Figura 27 - Tratamento intraperitoneal com BAY 41-2272 aumenta a sobrevivência de animais infectados por *C. albicans*, mas não por *S. aureus*



Camundongos C3H/HePas foram inoculados por via i.p. com *C. albicans* ($0,5 \times 10^6$ blastoporos) (A) ou *S. aureus* (5×10^6 CFU) (B) e tratados 48 horas depois via i.p. com itraconazol (20 mg/Kg) ou penicilina G (Penic; 5 KU/Kg) associada a tetraciclina (1 mg/Kg) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg). Acompanhamos os animais por 12 dias a contar do dia do inóculo para avaliar a taxa sobrevivência. Resultados representam uma curva de sobrevivência de 12 animais por grupo.

Avaliamos outro modelo de infecção, no qual os patógenos foram inoculados no coxim plantar das patas dos animais (via subcutânea). Esse protocolo nos permitiu avaliar um modelo de infecção local de consequências mais brandas para os animais. Além disso, pudemos fazer o tratamento dos animais de forma local, injeção do fármaco na lesão da pata, e de forma sistêmica, pela aplicação do fármaco no peritônio do animal. Nossos resultados mostraram que os animais tratados com o BAY 41-2272, assim como no modelo de infecção na cavidade peritoneal, mostraram uma resposta melhor à *C. albicans* (Figura 28 A,B), sendo seu efeito maior quando do tratamento local (Figura 28 B). Também nesse modelo, o fármaco foi menos efetivo na infecção por *S. aureus* (Figura 28 B).

Figura 28 - Tratamento intraperitoneal e intralesional com BAY 41-2272 diminui a infecção local por *C. albicans*, mas não por *S. aureus*



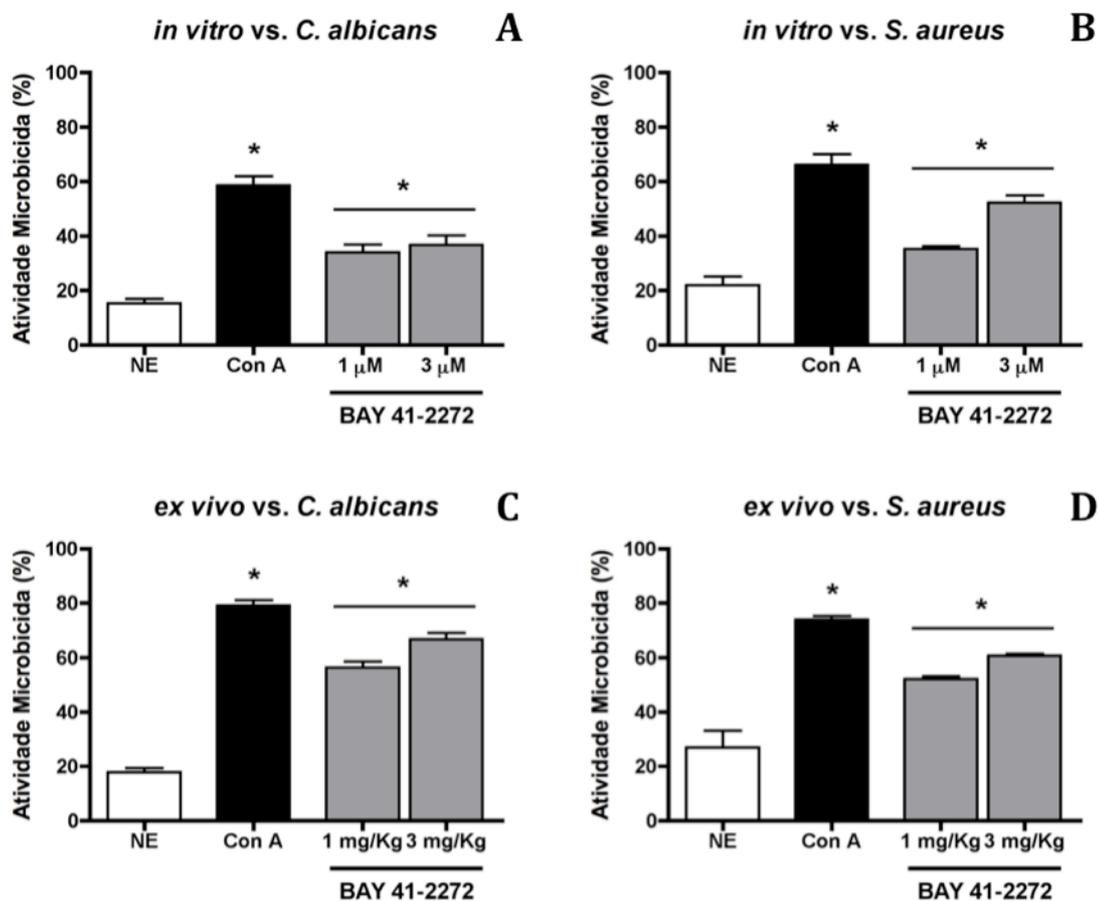
Camundongos C3H/HePas foram inoculados por via subcutânea (s.c.) no coxim plantar da pata traseira com *C. albicans* ($0,5 \times 10^6$ blastoporos) (A,B) ou *S. aureus* (5×10^6 CFU) (C,D) e tratados 48 horas depois via i.p. ou s.c. (mesma pata infectada) com itraconazol (Itrac; 20 mg/Kg) ou penicilina G (Penic; 5 KU/Kg) associada a tetraciclina (1 mg/Kg) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg). Após, 7 dias a contar do inóculo, medimos a espessura da pata. Os resultados expressam a média média \pm s.e.m. da espessura das patas ($n = 4$ experimentos, em triplicata). * para ANOVA $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

7.6 Avaliação da Atividade Microbicida de Macrófagos Peritoneais Tratados *ex vivo* ou *in vitro* com BAY 41-2272

Nos modelos *in vivo* de infecção por *C. albicans* e *S. aureus*, observamos que o tratamento com BAY 41-2272 foi mais eficaz em relação à proteção contra o fungo que a bactéria. Avaliamos então o potencial microbicida de macrófagos de animais tratados com o fármaco e macrófagos residentes tratados *in vitro* com o BAY 41-2272. Nesses modelos, comprovamos a eficiência do tratamento com o BAY 41-2272, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, em potencializar a atividade microbicida dos

macrófagos peritoneais (Figura 28), aumentando a resposta aos fungos (Figura 29 A e C) e bactérias (Figura 29 B e D) de forma similar.

Figura 29 - BAY 41-2272 aumenta a atividade microbicida *ex vivo* e *in vitro* de macrófagos peritoneais



Macrófagos residentes (A, B) de camundongos C3H/HePas foram obtidos e tratados *in vitro* com BAY 41-2272 (1 μM ou 3 μM) ou concanavalina A (2 μg/mL). Macrófagos de animais tratados (C, D) por via i.p. com concanavalina A (Con A; 0,5 mg/Kg) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 mg/Kg) por 48 horas foram também obtidos. Após a obtenção, essas células (2×10^6) foram incubadas com *C. albicans* (2:1) ou *S. aureus* (10:1) por duas horas. A atividade microbicida foi avaliada pela medida da redução de MTT pelas bactérias recuperadas dos macrófagos. Resultados representam média \pm s.e.m. do índice de atividade microbicida (n = 4 experimentos, em triplicata). * para ANOVA $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

7.7 Sumário dos Resultados

O tratamento de camundongos C3H/HePas, via intraperitoneal, com o BAY 41-2272:

- induziu intensa migração celular para o peritônio, principalmente de macrófagos, desde as primeiras horas de tratamento;
- acentuou o efeito inflamatório da carragenina aplicada na pata;
- potencializou o espriamento, atividade fagocítica, produção espontânea de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio induzida por PMA, de forma *ex vivo* em macrófagos peritoneais;
- aumentou a sobrevivência de camundongos desafiados com *C. albicans*;
- aumentou de forma *ex vivo* ou *in vitro* a atividade microbicida de macrófagos peritoneais contra *C. albicans* e *S. aureus*.



No decorrer desta pesquisa, buscamos enxergar além do conhecimento sobre a biologia e fisiologia celular dos fagócitos mononucleares. Em nosso trabalho, trazemos evidências que confirmam o potencial do BAY 41-2272, agonista de guanilato ciclase solúvel, e sua via, como uma ferramenta farmacológica eficaz para ativação de monócitos. Essas informações suscitam uma nova perspectiva no desenvolvimento de terapias para o controle de infecções bacterianas e fúngicas.

Estudos anteriores mostraram os efeitos do BAY 41-2272 aumentando, em células monocíticas, a liberação de espécies reativas de oxigênio, fagocitose e atividade microbicida contra *E. Coli* (Oliveira-Junior et al., 2007; Pereira et al., 2008). Neste estudo, avaliamos outros aspectos da resposta dos monócitos tratados com BAY 41-2272, como a capacidade do fármaco de alterar a expressão de marcadores de superfície. Nesse contexto, o tratamento aumentou significativamente a expressão de moléculas importantes, como o CD11b, CD18, CD14, TLR4, TLR2 e CD163 (**Figuras 6 e 7**) em monócitos de sangue e células THP-1. Todos esses receptores constituem importantes marcadores para definirmos o grau de diferenciação de monócitos. Estas alterações fenotípicas caracterizam, funcionalmente, fagócitos com maior capacidade de responder a infecções. Isto se deve ao fato dessas moléculas serem importantes receptores de reconhecimento de patógenos opsonizados ou não.

Especificamente, o complexo formado por CD18/CD11b ou CR3 (Mazzone, Ricevutti, 1995) é o principal receptor de complemento, ligando-se a microrganismos opsonizados com iC3b (Ross, Vetvicka, 1993). Os demais receptores estudados tem um mecanismo diferente, pois ligam-se diretamente à componentes dos microrganismos. O TLR2, por exemplo, reconhece desde peptidoglicanos e ácidos lipoteicóicos de bactérias gram-positivas e glicosilfosfatidilinositol em *T. cruzi*, a zymosan de fungos e β -glucana. Já o TLR4, com colaboração do CD14, reconhece LPS de bactérias gram-negativas, como *E. coli*, e glucuronoxilomanana de fungos (Medzhitov, 2001). No caso do receptor *scavenger* CD163, anteriormente relacionado apenas à homeostase, recentemente foi descrita sua função no reconhecimento e resposta a *S. aureus* (Fabriek et al., 2009; Kneidl et al., 2012).

Todas essas funções no reconhecimento de diferentes patógenos deixa clara a importância desses receptores para a adequada resposta de monócitos. Outros estudos relacionaram a expressão desses marcadores com a via da guanilato ciclase solúvel. Bailey et al. (2010) mostraram que, em células de epitélio das vias

respiratórias, o álcool aumenta a expressão de TLR2 via NO/GMPc/PKG. Já Roy et al. (2006) mostraram uma nova via biológica para o NO, regulando o aumento da expressão de CD11b em microglia de forma dependente de GMPc/PKG/CREB. Esses resultados corroboram com o aumento das expressões induzido pelo BAY 41-2272, caracterizando este fármaco como um modulador importante da resposta imune de fagócitos, e ainda confirmando a importância de sua via na biologia dessas células.

Como demonstrado, a via da GCs, ativada pelo fármaco, está envolvida na alteração de fenótipo promovida pelo BAY 41-2272. Além disso, esse aumento na expressão dos receptores pode estar relacionado com a produção de citocinas importantes para ativação celular e acentuação da resposta dos monócitos. Nessa conjuntura, observamos que o BAY 41-2272 aumentou significativamente a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (**Figuras 8 e 9**) por monócitos de sangue e células THP-1. Estas são importantes citocinas pró-inflamatórias intimamente ligadas com a função dos monócitos, aumentando seu potencial fagocítico/microbicida e induzindo sua diferenciação. Além dessas citocinas, o fármaco aumentou a liberação de IL-12p70 (**Figura 8 D e 9 D**), uma das principais mediadoras entre a resposta imune inata e a adaptativa (Ma, Trinchieri, 2001).

O aumento na liberação dessas citocinas mostra o potencial do BAY 41-2272 em modular não só os monócitos, mas também outras células da resposta imune. Essas citocinas participam do estabelecimento do processo inflamatório e da resolução de quadros infecciosos. Elas ativam outros fagócitos, como neutrófilos, e até mesmo células do endotélio vascular, aumentando a expressão de moléculas de adesão e produção de quimiocinas, e conseqüentemente, a migração celular (Marin et al., 2001; Miller et al., 2004; Yoshida et al., 1999). De forma geral, o fármaco não só ativa diretamente os monócitos, mas também pode ter seu efeito potencializado pela ação secundária das citocinas que induz. Ainda, o fato de aumentar a produção de IL-12 sugere que o fármaco consegue ativar indiretamente mecanismos importantes da imunidade adaptativa, como o eixo IL-12/IFN- γ , essencial para a resposta apropriada a alguns patógenos, por exemplo micobactérias (Netea et al., 2005).

Esse aumento na produção das citocinas, assim como na expressão dos receptores de superfície, auxiliam a confirmar a importância da via do BAY 41-2272. Por exemplo, a indução de RNAm de IL-6 em macrófagos foi suprimida pela inibição

de GCs, sugerindo o envolvimento de GMPc (Tamion et al., 1999). Ainda em relação à IL-6, foi observado que inibidores de NO/GMPc/PKG previnem a indução de RNAm de IL-6 em linhagem de osteoclastos (Broderick et al., 2007). E a produção dessas citocinas não só confirma a participação da via da guanilato ciclase solúvel, mas leva a considerar outras moléculas envolvidas nessa ativação. Dentre estas, podemos citar o NF- κ B, envolvido na expressão de IL-1, IL-6 e TNF- α . Nesse contexto, Siednienko et al. (2011) mostraram que o NO induz a expressão de IL-6 de forma dependente de GMPc/PKG, com participação do fator NF- κ B. Essas vias e fator de transcrição fornecem evidências da sequência de sinalização que é gerada pela ação do BAY 41-2272.

Como visto, existem evidências significativas da participação da via GCs/GMPc/PKG na expressão de moléculas de superfície e produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias. Evidências estas que suportam nossos achados em relação ao tratamento com o BAY 41-2272. Avaliando as implicações do tratamento com este fármaco sobre a expressão de outros genes importantes para o funcionamento dos fagócitos, observamos o aumento da expressão de *CYBA* e *NCF2* (**Figura 10**) em monócitos de sangue e células THP-1. Estes genes codificam, respectivamente, a p22^{PHOX} e p67^{PHOX}, importantes componentes do sistema NADPH oxidase. Além da expressão gênica, a expressão protéica dos componentes desse sistema - p67^{PHOX} e gp91^{PHOX} - encontravam-se aumentadas após o tratamento (**Figuras 11 e 12**).

Esses resultados mostram que o BAY 41-2272 não possui apenas uma ação na ativação imediata do sistema NADPH oxidase, mas também na manutenção dessa ativação pelo aumento da expressão de seus componentes. Sendo as espécies reativas de oxigênio essenciais para a resposta contra patógenos, o fato de ativar o sistema NADPH oxidase, por si só, é uma das evidências mais importantes do potencial do BAY 41-2272 para seu uso como terapia em processos infecciosos. Esse fato aliado aos seus outros efeitos (aumento da expressão de receptores e citocinas pró-inflamatórias) reforçam sua característica de indutor de resposta microbicida.

O aumento da expressão desses genes, em conjunto com os demais resultados, nos levam a inferências diretas das vias de ação do BAY 41-2272. Esses resultados nos sugerem de forma mais clara a participação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, na ativação gerada pelo fármaco. Em análises

computacionais do promotor do gene *CYBA*, foram identificados três sítios putativos de ligação para o fator NF- κ B, que regula transcricionalmente o gene (Manea et al., 2007). A importância desse fator de transcrição foi observada não só por análises *in silico*, mas também em modelos de linhagem monocítica. Anrather et al. (2006) mostraram que a expressão de *gp91^{PHOX}* é dependente de p65/RelA. Gauss et al. (2007) mostraram que a inibição da ativação de NF- κ B bloqueou a expressão de *CYBB*, *NCF1* e *NCF2*, induzida por TNF- α . Ainda, em modelo de células U937 *knockdown* para esse fator, Luengo-Blanco et al. (2008) confirmaram a necessidade de NF- κ B para expressão de *CYBB* e *NCF1*.

Todas essas fortes evidências da ativação do NF- κ B pelo BAY 41-2272, nos levaram a avaliar seu efeito sobre esse fator de transcrição. Em monócitos de sangue e células THP-1, observamos que o fármaco induz a degradação do I κ B α (**Figura 13**), inibidor do NF- κ B, levando à fosforilação desse fator de transcrição (subunidade p65) (**Figura 14**). A ativação desse fator é indispensável para diversas funções em diferentes tipos celulares. Como citado anteriormente, participa de processos inflamatórios, induzindo a transcrição de citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, componentes do sistema NADPH oxidase e moléculas de adesão, que regulam a migração celular ao local de resposta. Ainda, em monócitos, o NF- κ B, induzido ou constitutivo, está relacionado com regulação de íons, balanceamento na produção de EROs e transcrição de genes anti-apoptóticos (Choi et al., 2007; Ginis et al., 2000; Moon et al., 2010).

Uma vez que o NF- κ B está envolvido diretamente com a diferenciação de monócitos, a ativação desse fator de transcrição, juntamente com a potencialização da liberação de citocinas e expressão de genes dependentes desse fator, confirmam a nossa hipótese de que as ações do BAY 41-2272 vão além da ativação de respostas agudas dessas células. Ainda, a degradação de I κ B α e fosforilação de NF- κ B foram reduzidas significativamente com a inibição da enzima guanilato cilcase solúvel (pelo ODQ) e da proteína quinase G (pelo DT-3) antes do tratamento com o fármaco. A ativação desse fator pela PKG já havia sido demonstrada em linfócitos T (He, Weber, 2003), em células de epitélio pulmonar (Chang et al., 2004) e neurônios (Bonthius et al., 2009). No entanto, nossos resultados confirmam a ativação específica da GCs pelo BAY 41-2272, acionando a principal quinase dessa via, a PKG, e ativação do fator de transcrição NF- κ B, essencial para as funções dos monócitos.

Para comprovar a importância desse fator de transcrição na ação do BAY 41-2272 sobre as funções biológicas dos fagócitos mononucleares, avaliamos o sistema NADPH oxidase em células pró-monocíticas U937 *knockdown* para NF- κ B (U937^{S32/36A}). Nesse contexto, as células U937^{S32/36A} apresentaram uma resposta acentuada, quando a avaliação da produção de O₂⁻ foi realizada após duas horas de tratamento com BAY 41-2272 (**Figura 15**), sugerindo a fosforilação dos componentes da NADPH oxidase pela PKG. No entanto, em células U937^{S32/36A} pré-tratadas por 48 horas com o fármaco não observamos o aumento da resposta para um estímulo secundário com PMA e LPS, como visto em células U937 sem a mutação (**Figura 15**). Esses resultados confirmam a ativação do NF- κ B pelo BAY 41-2272, e a necessidade desse fator para o *priming* dos fagócitos mononucleares. Ainda, pudemos observar que em células U937 não tratadas previamente com o fármaco não houve indução de *burst* oxidativo pelo LPS, ao passo que as células incubadas por 48 horas com o BAY 41-2272 responderam à esse estímulo (**Figura 15 A**). Esse resultado possivelmente está relacionado ao aumento da expressão de TLR4 por monócitos e células pró-monocíticas THP-1 induzida pelo fármaco, o que também foi observado nas células U937 (**APÊNDICE B**).

Avaliamos também a expressão de *CYBB* e *NCF2*, em células U937 apresentando ou não a mutação no I κ B α . Assim como para os monócitos de sangue e células THP-1, houve um aumento da expressão desses genes nas células U937 selvagens tratadas com o BAY 41-2272. No entanto, as células U937^{S32/36A} não apresentaram a indução desses genes da NADPH oxidase (**Figura 16**). Como discutido anteriormente, vários estudos mostram a importância do NF- κ B para expressão desses componentes da NADPH oxidase (Anrather et al., 2006; Gauss et al., 2007; Luengo-Blanco et al., 2008). Esses resultados somam-se ao conhecimento da literatura e confirmam a importância desse fator de transcrição na ação do fármaco em fagócitos mononucleares.

O tratamento de monócitos de sangue e células pró-monocíticas (THP-1 e U937) com BAY 41-2272 ativou vias de sinalização essenciais (NF- κ B) para as funções destas células e, conseqüentemente, aumentou a expressão de receptores de reconhecimento de patógenos e diferenciação para um perfil mais responsivo à estes microrganismos. Uma vez que, para indivíduos imunodeficientes, as terapias alternativas para o tratamento de infecções são raras, avaliamos o potencial do BAY 41-2272 em monócitos de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC) e

pacientes com deficiência de mieloperoxidase (MPO). Nos dois casos, os pacientes apresentam mutações no gene *CYBB* ou MPO, apresentando GCs, PKG e NF- κ B funcionais (**APÊNDICES C e D**).

Nos monócitos desses pacientes, o tratamento com o fármaco potencializou significativamente a fagocitose de partículas de zymosan, *S. aureus* e *C. albicans* (**Figura 17**). Esse aumento da fagocitose foi precedido pela indução da expressão de TLR2 e CD163 (**APÊNDICE E**). O aumento no potencial fagocítico das células dos pacientes com DGC ou com deficiência de MPO é um primeiro indício de que as vias ativadas pelo BAY 41-2272 podem ser uma rota compensatória para restaurar a função de fagócitos defeituosos. No entanto, o aumento na fagocitose não indica diretamente a indução dos mecanismos microbicidas dessas células.

Portanto, avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio pelos monócitos dos pacientes após o tratamento com o fármaco. Após o tratamento por 48 horas, o BAY 41-2272 aumentou a produção de O_2^- e H_2O_2 por monócitos de pacientes com deficiência de MPO pós-estimulados com PMA, *S. aureus* ou *C. albicans* (**Figuras 18 e 19**). No entanto, os monócitos de pacientes com DGC não responderam ao tratamento em relação à produção de reativos de oxigênio. Esses foram resultados esperados do ponto de vista dos mecanismos afetados em cada patologia. Os pacientes com deficiência de MPO apresentam um sistema NADPH oxidase funcional, tendo uma falha em converter o H_2O_2 produzido em outros reativos, como ácido hipocloroso (Mauch et al., 2007). Essa falha ficou evidente pelo fato dos monócitos desses pacientes produzirem/acumularem grandes quantidades de O_2^- e H_2O_2 . O tratamento potencializou o acúmulo desses reativos. Os pacientes com DGC apresentam mutações no gene *CYBB*, codificador de um dos principais componentes do sistema NADPH oxidase. Essas mutações levam à falha completa do sistema, impedindo, à princípio, qualquer tentativa farmacológica de aumentar essa produção.

Mesmo com uma resposta negativa para a produção de espécies reativas de oxigênio por parte dos pacientes com DGC, avaliamos o potencial microbicida de seus monócitos e também de monócitos de pacientes com deficiência de MPO. Essa avaliação, assim como a fagocitose e avaliação de *burst* oxidativo, foi feita em relação à *S. aureus* e *C. albicans*, pois estes são dois dos patógenos mais comumente associados à essas IDPs. interessante, o pré-tratamento com BAY 41-2272 aumentou significativamente a atividade microbicida dos monócitos

dos pacientes (DGC e deficiência de MPO) contra os dois patógenos em questão (**Figura 20**). Esse é um resultado importante, uma vez que o fármaco não reparou os defeitos nos mecanismos microbicidas dependentes de reativos de oxigênio, intrínsecos à essas células.

Mesmo sem influenciar no sistema NADPH oxidase / MPO, o BAY 41-2272 potencializou outras respostas das células desses pacientes. Por este motivo, não podemos descartar o efeito do fármaco em mecanismos microbicidas independentes de reativos de oxigênio. Dentre estes, podemos citar a ação das V-ATPases, que acidificam o pH do fagossomo pela transferência de H⁺ (hidrólise de ATP) (Griffiths et al., 1988). Esta acidificação não só cria um ambiente hostil para o patógenos, mas também favorece a atividade de uma série de enzimas hidrolíticas. Uma dessas enzimas é a NRAMP1 (do inglês, *natural resistance-associated macrophage protein 1*), bacteriostática, que retira do fagossomo íons divalentes (Fe²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺), importantes cofatores para enzimas dos patógenos (Cellier et al., 2007). Também já foi demonstrada a expressão de defensinas por macrófagos (Duits et al., 2002; Nickel et al., 2012). Estas proteínas induzem a permeabilização das membranas das bactérias pela formação de canais permeáveis à íons (Lehrer et al., 1993).

Além desses mecanismos, nos quais o BAY 41-2272 pode estar envolvido, a produção de óxido nítrico não pode ser descartada. Alguns trabalhos já evidenciaram o aumento da produção de óxido nítrico por neutrófilos de pacientes com DGC tratados com IFN- γ (Ahlin et al., 1999; Naderi beni et al., 2012). Seguindo este raciocínio, a possibilidade do fármaco induzir a expressão/ativação da enzima iNOS deve-se ao fato do promotor do seu gene possuir sítios de ligação para fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, ativados pela via GMPc/PKG (Andoh et al., 2003; Chang et al., 2009; Siednienko et al., 2011). Essa possível ativação da iNOS é mais uma importante via a ser avaliada no contexto do tratamento com o BAY 41-2272, deixando ainda mais clara a ação do fármaco na reconstituição da resposta imune de monócitos.

Nossos estudos envolvendo monócitos humanos comprovaram a ativação e diferenciação dessas células pelo BAY 41-2272, acionando o NF- κ B, fator de transcrição indispensável para as funções dos fagócitos mononucleares. Ainda, o tratamento com fármaco potencializou a atividade microbicida de monócitos de pacientes com deficiências nas vias de *killing* dependentes de espécies reativas de oxigênio (DGC e deficiência de MPO). Passamos, então, a estudar os efeitos do

BAY 41-2272 em modelo animal, pois permitiu a avaliação das ações sistêmicas do fármaco.

Em camundongos C3H/HePas, o fármaco foi administrado intraperitonealmente de forma aguda, por 48 horas. À princípio, a administração do BAY 41-2272 não alterou o consumo de ração ou água, assim como não alterou o comportamento (por exemplo, aumento da agressividade) dos animais. Estudos anteriores, mostraram que o fármaco, nas doses usadas, não apresenta toxicidade em relação ao fígado, rins e intestino. Estes estudos nos levam a crer que, à princípio, o BAY 41-2272 não apresenta efeitos colaterais severos aos animais.

O tratamento feito pela via intraperitoneal nos permitiu avaliar a migração celular e indução de peritonite nesses animais. O BAY 41-2272 induziu um aumento significativo no número total de células do peritônio, sendo esta população constituída principalmente por macrófagos desde as primeiras horas de tratamento com o fármaco (**Figura 22**). Esse ambiente caracteriza uma reação inflamatória atípica, uma vez que os neutrófilos são as primeiras células a migrar de forma abundante para os sítios inflamatórios (Afonso et al., 1998). Esta forma atípica de inflamação fica ainda mais evidente se compararmos os efeitos do BAY 41-2272 com a migração induzida por tioglicolato, inicialmente composta por polimorfonucleares que dão lugar aos macrófagos.

Este dado demonstra *in vivo* o potencial do BAY 41-2272 em induzir inflamação mediada, principalmente, por fagócitos mononucleares, nesse caso macrófagos. Ainda, não observamos alterações no número de células dos demais órgãos linfóides avaliados, baço, medula óssea e linfonodo mesentérico (**Figura 23**). Nesse contexto, o tratamento com o fármaco mostrou um efeito pró-inflamatório no local de administração. Isoladamente, esses resultados mostram que o fármaco potencializa a migração celular e induz o acúmulo de macrófagos no peritônio. Essa peritonite, à princípio, pode ser considerada danosa para o organismo, podendo levar à lesão tecidual. No entanto, se extrapolarmos esses efeitos para um sítio de infecção, a migração de macrófagos será de grande importância para resolução do processo infeccioso.

Essa resposta inflamatória aguda é caracterizada por um aumento na permeabilidade vascular e no infiltrado celular, levando à formação de edema como resultado do extravasamento de fluido e proteínas, e acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório. Esse processo envolve muitos mediadores, como histamina,

serotonina, prostaglandinas e o óxido nítrico, entre outros, os quais são produzidos ou liberados por diferentes tipos celulares, como macrófagos, células endoteliais e células nervosas sensoriais (Arya, Kumar, 2005; Posadas et al., 2004).

Para estudar a extensão dos efeitos pró-inflamatórios do BAY 41-2272, avaliamos a formação de edema de pata induzido por carragenina após o tratamento. Os animais tratados com o fármaco por dois dias apresentaram um edema de pata significativamente maior que aqueles do grupo não tratado (**Figura 24**), mostrando atividade pró-edematogênica em um processo inflamatório inespecífico, como o induzido por carragenina. Esse resultado condiz com o efeito vasodilatador descrito como resultado do tratamento com o fármaco em questão (Cau et al., 2008; Thorsen et al., 2010). Ainda, a via da guanilato ciclase solúvel possui papel importante no aumento da permeabilidade vascular (Morbidelli et al., 2010; Schmidt et al., 2008). Ainda, o fármaco, ou o processo gerado por ele, mostrou ter ação pró-inflamatória sistêmica, uma vez que o tratamento intraperitoneal influenciou no processo inflamatório na pata.

Essa resposta pró-inflamatória induzida pelo fármaco, assim como tratamento *in vitro* de células humanas, pode estar relacionada com os fagócitos mononucleares. Nesse contexto, observamos que o tratamento com BAY 41-2272 aumentou a habilidade de espraiamento dos macrófagos peritoneais (**Figura 25 A**). Essa é uma importante característica de macrófagos ativados, uma vez que está associada com o aumento na migração e atividade fagocítica. E este fato fica claro na potencialização da fagocitose por essas células (**Figura 25 B**). É importante ressaltar que esses resultados são de habilidades *ex vivo* dos macrófagos, uma vez que estas células foram obtidas de animais tratados com o BAY 41-2272 e não receberam nenhum estímulo *in vitro* posterior. O aumento no espraiamento é importante tanto para o processo de fagocitose e também para os processos migratórios para os sítios inflamatórios (Tatefuji et al., 1996). Ao lado desta propriedade, a fagocitose constitui a primeira linha de interação entre os macrófagos e patógenos, como já discutido.

Alterações no espraiamento e na atividade fagocítica implicam em mudanças de expressão de moléculas de membrana e alterações morfológicas dos macrófagos. Bóran et al. (2008) mostraram que tanto ANP - ativador de guanilato ciclase solúvel, quanto dibutyryl-GMPc - análogo permeável de GMPc, promovem uma rápida liberação e aumento de tamanho de filamentos em microglia. Essas

alterações morfológicas envolvem o aumento e redistribuição de f-actina, resultando no aumento da atividade fagocítica (Stuart et al., 2007). Os rearranjos de actina e fagocitose de partículas inertes são bloqueados por inibidores de PKG (Bóran, García, 2007). Essas evidências anteriores, juntamente com os nossos resultados, confirmam que a via ativada pelo BAY 41-2272 ativa diretamente em funções importantes dos macrófagos.

Não só a fagocitose, mas também a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão relacionadas a quase todas as respostas antimicrobianas. Em nosso estudo, apesar do aumento na atividade fagocítica, não observamos um aumento na liberação espontânea de peróxido de hidrogênio (**Figura 26 A**). Este resultado pode estar relacionado com vias anti oxidantes ativadas pela GMPc e, principalmente, AMPc. Essas vias estão envolvidas na ativação de PGC-1 α (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator*) e de Gpx-1 (do inglês *Glutathione peroxidase 1*), com importante propriedade antioxidante (Lu et al., 2010). Essa propriedade antioxidante tem papel importante, pois promove a eliminação e inibição de radicais livres o que dá proteção ao organismos durante os processos inflamatórios, infecciosos e doenças degenerativas (Gupta et al., 2004).

Contudo a propriedade antioxidante do BAY 41-2272 não parece ser permanente, uma vez que a adição de PMA às culturas de macrófagos provenientes de camundongos tratados com o fármaco induziu a liberação de altos níveis desse H₂O₂. O PMA é um potente iniciador do *burst* oxidativo, uma vez que ele ativa a PKC (Pontremoli, Melloni, 1988). Então, nossos resultados indicam que o tratamento com BAY 41-2272 age pré-ativando os macrófagos, o que pode acentuar a subsequente atividade microbicida dessas células. Além disso, a existência de um controle antioxidante diminui a possibilidade de danos teciduais durante a inflamação induzida pelo fármaco.

Apesar do tratamento com BAY 41-2272 não ter induzido a liberação espontânea de H₂O₂, ele aumentou a produção espontânea de óxido nítrico (**Figura 26 B**). Esse reativo tem papel importante na resposta microbicida, como sinalizador para outras células imunes ou efetivamente degradando DNA, proteínas e lipídeos dos patógenos (Fang, 1997; Joerink et al., 2006; Tripathi et al., 2007). A produção de NO por macrófagos ativados é um resultado da indução e da expressão gênica de iNOS (MacMicking et al., 1997). O BAY 41-2272 ativa fatores de transcrição, como

NF- κ B e AP-1, que se ligam ao promotor do gene dessa enzima (Andoh et al., 2003; Chang et al., 2009; Siednienko et al., 2011). O aumento da produção de NO por macrófagos murinos, induzido pelo fármaco, constitui um passo a mais para explicar como o tratamento com o fármaco restaurou a função microbicida dos monócitos de pacientes com DGC.

Todos os efeitos do BAY 41-2272, ativando os macrófagos, nos levaram a avaliar o potencial do fármaco para controlar infecções *in vivo*. A administração do BAY 41-2272 48 horas após a infecção, aumentou significativamente a sobrevivência dos animais desafiados com *C. albicans* (**Figura 27 A**). Em relação ao desafio com *S. aureus*, o tratamento não se mostrou tão eficiente (**Figura 27 B**). As diferentes respostas aos patógenos, podem ser relacionadas aos mecanismos ativados pelo BAY 41-2272, mais direcionados a resposta contra fungos. O *S. aureus* induz um quadro pró-inflamatório intenso (Niska et al., 2012), o que pode ter sido potencializado pela administração do fármaco. Esses quadros de inflamação severas são tão ou, em muitos casos, mais nocivos ao organismo que a própria infecção (Nguyen, Nguyen, 2009). No entanto, necessitamos de mais evidências, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e análise histológica de órgãos (verificar a presença de infiltrados de neutrófilos), para comprovar essa inflamação desregulada.

A partir dessas observações, testamos o fármaco em um modelo de infecção subcutâneo, com o objetivo de minimizar os efeitos da inflamação gerada pelo patógeno. Além disso, esse modelo nos permitiu tratar os animais diretamente no local da infecção (injeção do fármaco na lesão da pata) ou de forma sistêmica (aplicação do fármaco no peritônio do animal). Assim como no modelo de infecção na cavidade peritoneal, os animais tratados com BAY 41-2272 apresentaram melhor resposta à *C. albicans*, sendo seu efeito maior quando o tratamento foi local (**Figura 28 B**). Os resultados em modelos humanos, mostram que os monócitos são ativados pelo tratamento com o BAY 41-2272, aumentando vias essenciais para defesa contra cândida, como expressão de TLR2. Nossos resultados *in vivo* confirmam essa ativação, definindo o efeito do fármaco na indução da resposta contra *C. albicans*.

Em relação à infecção por *S. aureus*, somente o tratamento intralesional na dose mais alta surtiu efeito na diminuição do tamanho da pata (**Figura 28 C e D**). Nossos estudos apresentam muitas evidências de que o fármaco atua de forma

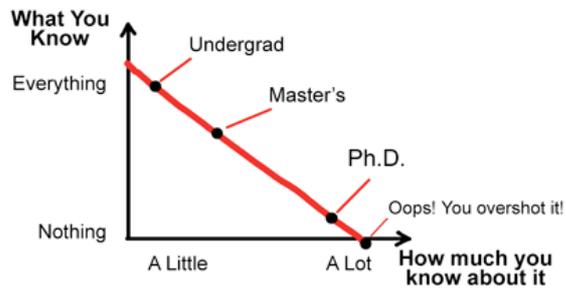
eficiente os fagócitos, desse modo fica mais forte a sugestão de que o BAY 41-2272 potencialize uma inflamação no local da infecção pela bactéria. Kinsman et al. (1981) testaram as reações inflamatórias da proteína A, constituinte da parede de *S. aureus*, e identificaram uma resposta de edema em tecido injetado com esta proteína. Esse tipo de resposta gerada pela bactéria, agregada à resposta pró-inflamatória do BAY 41-2272, pode ser o motivo da não redução no tamanho da pata infectada. Sugerimos então que o aumento na espessura da pata não se dá pela presença e aumento da infecção, mas sim pela manutenção do influxo de células inflamatórias para o sítio de resposta.

Uma vez que não temos os cortes histológicos para comprovar o influxo de células inflamatórias para o sítio infeccioso e eliminação do patógeno, investigamos o efeito *in vitro* e *ex vivo* do BAY 41-2272 sobre a capacidade microbicida dos macrófagos peritoneais. Nesse contexto, o fármaco, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, potencializou a atividade microbicida dos macrófagos peritoneais (**Figura 29**). Esse aumento na resposta microbicida se deu, de forma similar, em relação aos dois patógenos. Esses resultados comprovam o potencial do fármaco para tratar infecções por fungos, especificamente por *C. albicans*, como mostrado pelo modelo *in vivo*. Além disso, nossos dados mostram que o tratamento é eficiente em promover o *killing* de *S. aureus*. Dessa forma, nossa hipótese de que a aparente não resolução da infecção por *S. aureus* nos modelos *in vivo* (**Figuras 27 e 28**), na verdade constitui uma manutenção da inflamação gerada pelo patógeno e potencializada pelo fármaco. Ainda, essa acentuação da atividade microbicida, provavelmente é consequência do aumento da fagocitose, do *burst* oxidativo e da produção de reativos de nitrogênio. No entanto, não podemos excluir a participação de outros processos, como acidificação do pH do fagossomo, transporte de íons e liberação de enzimas lisossomais e de grânulos, não avaliados até o presente momento.

Outro ponto importante foi o fato do tratamento *ex vivo* mostrar ser mais potente que o *in vitro*. Sabemos que o ambiente fisiológico (organismo) é mais complexo que o artificial (meio de cultura), apresentando células e mediadores químicos envolvidos com a ativação e modulação das respostas imunológicas. Provavelmente, a ação do BAY 41-2272 direta ou indireta, passando pelos macrófagos, gera um ambiente com um número significativamente maior de estímulos para resposta imune adequada.

Como um todo, nossos resultados comprovam o potencial do BAY 41-2272 como ativador de monócitos. Tanto *in vitro*, quanto em um ambiente fisiológico, o fármaco demonstrou ser muito eficaz no controle dos processos infecciosos. Além disso, demonstramos que a via da guanilato ciclase solúvel (GCs→GMPc→PKG) apresenta papel importante na diferenciação/ativação dos monócitos. A regulação da resposta desses fagócitos pelo BAY 41-2272 ocorre, entre outros mecanismos pelo acionamento do fator de transcrição NF- κ B. Ainda mais importante, o tratamento com o BAY 41-2272 *in vitro*, recuperou o potencial microbicida de monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO. Esses dados mostram que o estudo de vias de sinalização dos fagócitos podem levar ao desenvolvimento de novas terapias para o controle de infecções em pacientes imunodeficientes.

What You Know vs How much you know about it



JORGE CHAM © 2008

WWW.PHDCOMICS.COM

Nossos estudos confirmaram o potencial do agonista de guanilato ciclato solúvel, BAY 41-2272, como alternativa para o tratamento de infecções em pacientes imunodeficientes, pela sua ação na diferenciação e ativação de monócitos humanos. Ainda, o tratamento com o BAY 41-2272:

- induziu a diferenciação de monócitos de sangue periférico (PBM) e células THP-1, aumentando a expressão de CD11b, CD18, CD14, TLR4, TLR2 e CD163;
- induziu, em PBM e THP-1, um perfil pró-inflamatório, aumentando a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12p70;
- induziu a expressão gênica (*CYBB*, *CYBA* e *NCF2*) e protéica (p67^{PHOX} e gp91^{PHOX}) dos componentes do sistema NADPH oxidase, importante mecanismo microbicida dos fagócitos mononucleares;
- ativou o fator de transcrição NF- κ B (p65) de forma dependente de guanilato ciclase solúvel e PKG;
- restaurou a atividade microbicida contra *S. aureus* e *C. albicans* de monócitos de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica ou com Deficiência de Mieloperoxidase.

Os dados gerados a partir do modelo animal, corroboram com a idéia de que o BAY 41-2272, pode ser usado como tratamento contra infecções. Além disso, o BAY 41-2272 administrado intraperitonealmente em camundongos C3H/HePas:

- induziu peritonite atípica, com intensa migração celular de macrófagos, desde as primeiras horas de tratamento;
- induziu um ambiente pró-inflamatório não só no peritônio, mas sistêmico, acentuando o efeito da carragenina injetada na pata;
- ativou mecanismos essenciais da resposta dos macrófagos peritoneais à infecções (fagocitose, produção espontânea de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio induzida por PMA);
- acentuou a resposta microbicida dos macrófagos peritoneais a *S. aureus* e *C. albicans*, aumentando a sobrevivência dos camundongos à essas infecções.

REFERÊNCIAS¹

Afonso A, Lousada S, Silva J, Ellis AE, Silva MT. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis Aquat Organ*. 1998 Sep 11;34(1):27-37.

Agudelo-Flórez P, Prando-Andrade CC, López JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FJ, de Souza Paiva MA, Roxo P Jr, Grumach A, Jacob CA, Carneiro-Sampaio MM, Newburger PE, Condino-Neto A. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Feb;46(2):243-52.

Ahlin A, Lärfsars G, Elinder G, Palmblad J, Gyllenhammar H. Gamma interferon treatment of patients with chronic granulomatous disease is associated with augmented production of nitric oxide by polymorphonuclear neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 May;6(3):420-4.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499–511.
Andoh T, Chiueh CC, Chock PB. Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates the expression of thioredoxin and thioredoxin peroxidase-1 during hormesis in response to oxidative stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2003 Jan 10;278(2):885-90.

Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem*. 2006 Mar 3;281(9):5657-67.

Appelberg R. Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. *J Leukoc Biol*. 2006 Jun;79(6):1117-28.

Arya S, Kumar VL. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. *Mediators Inflamm*. 2005 Aug 31;2005(4):228-32.

Asin S, Taylor JA, Trushin S, Bren G, Paya CV. IkappaB mediates NF-kappaB activation in human immunodeficiency virus-infected cells. *J Virol*. 1999 May;73(5):3893-903.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.

Bailey KL, Sisson JH, Romberger DJ, Robinson JE, Wyatt TA. Alcohol up-regulates TLR2 through a NO/cGMP dependent pathway. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010 Jan;34(1):51-6.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol.* 2001;1:13.

Bischoff E, Schramm M, Straub A, Feurer A, Stasch JP. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylyl cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection in vivo. *Urology.* 2003 Feb;61(2):464-7.

Bokoch GM. Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 1995 Mar;5(3):109-13.

Bonadies N, Neururer Ch, Steege A, Vallabhapurapu S, Pabst T, Mueller BU. PU.1 is regulated by NF-kappaB through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene.* 2010 Feb 18;29(7):1062-72.

Bonthius DJ, Luong T, Bonthius NE, Hostager BS, Karacay B. Nitric oxide utilizes NF-kappaB to signal its neuroprotective effect against alcohol toxicity. *Neuropharmacology.* 2009 Mar;56(3):716-31.

Borán MS, Baltrons MA, García A. The ANP-cGMP-protein kinase G pathway induces a phagocytic phenotype but decreases inflammatory gene expression in microglial cells. *Glia.* 2008 Mar;56(4):394-411.

Borán MS, García A. The cyclic GMP-protein kinase G pathway regulates cytoskeleton dynamics and motility in astrocytes. *J Neurochem.* 2007 Jul;102(1):216-30.

Borges de Oliveira-Junior E, Thomazzi SM, Rehder J, Antunes E, Condino-Neto A. 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 Jul 12;567(1-2):43-9.

Broderick KE, Zhang T, Rangaswami H, Zeng Y, Zhao X, Boss GR, Pilz RB. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP)/cGMP-dependent protein kinase induce interleukin-6 transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol.* 2007 May;21(5):1148-62.

Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.* 2001 Apr;99(1):7-17.

Burger D, Dayer JM. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;966:464-73.

Cabral-Marques O, Arslanian C, Ramos RN, Morato M, Schimke L, Soeiro Pereira PV, Jancar S, Ferreira JF, Weber CW, Kuntze G, Rosario-Filho NA, Costa Carvalho BT, Bergami-Santos PC, Hackett MJ, Ochs HD, Torgerson TR, Barbuto JA, Condino-Neto A. Dendritic cells from X-linked hyper-IgM patients present impaired responses

to *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Mar;129(3):778-86.

Carter AM. Inflammation, thrombosis and acute coronary syndromes. *Diab Vasc Dis Res*. 2005 Oct;2(3):113-21.

Cau SB, Dias-Junior CA, Montenegro MF, de Nucci G, Antunes E, Tanus-Santos JE. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol*. 2008 Feb 26;581(1-2):132-7.

Cellier MF, Courville P, Campion C. Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes Infect*. 2007 Nov-Dec;9(14-15):1662-70.

Chang MS, Lee WS, Chen BC, Sheu JR, Lin CH. YC-1-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by cGMP-dependent activations of Ras, phosphoinositide-3-OH-kinase, Akt, and nuclear factor-kappaB in human pulmonary epithelial cells. *Mol Pharmacol*. 2004 Sep;66(3):561-71.

Chang SF, Chou BH, Yang LM, Hsu FL, Lin WK, Ho Y, Lin SJ. Microbial transformation of isosteviol oxime and the inhibitory effects on NF-kappaB and AP-1 activation in LPS-stimulated macrophages. *Bioorg Med Chem*. 2009 Sep 1;17(17):6348-53.

Chen HM, Pahl HL, Scheibe RJ, Zhang DE, Tenen DG. The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity. *J Biol Chem*. 1993 Apr 15;268(11):8230-9.

Choi CH, Xu H, Bark H, Lee TB, Yun J, Kang SI, Oh YK. Balance of NF-kappaB and p38 MAPK is a determinant of radiosensitivity of the AML-2 and its doxorubicin-resistant cell lines. *Leuk Res*. 2007 Sep;31(9):1267-76.

Condino-neto A, Muscará MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandão AC, Grumach AS, De Nucci G. Effect of therapy with recombinant human interferon-gamma on the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. *J Interferon Cytokine Res*. 1996 May;16(5):357-64.

Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3548-54.

Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem*. 2003 Jul 18;278(29):26480-7.

Cruz GV, Pereira PV, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB, Aragão-Filho WC, Maciel MC, Silva LA, Amaral FM, Barroqueiro ES, Guerra RN, Nascimento FR. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production

induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *J Ethnopharmacol.* 2007 Apr 20;111(1):148-54.

da Silva FR. Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo [tese (Doutorado em Veterinária)]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2003.

Dang PM, Cross AR, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13;98(6):3001-5.

de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol.* 2011 May;73(5):420-7.

DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15;101(2):455-63.

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

Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Djaldetti R, Bessler H. Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc Res Tech.* 2002 Jun 15;57(6):421-31.

Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology.* 2002 Aug;106(4):517-25.

Eder C. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology.* 2009 Jul;214(7):543-53.

El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005 May-Jun;53(3):199-206.

Errante PR, Frazão JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2008 Nov;3(3):225-30.

Faas MM, Moes H, de Vos P. Monocyte cytokine production during pregnancy. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):153-4.

Fabriek BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 2009 Jan 22;113(4):887-92.

Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*. 1997 Jun 15;99(12):2818-25.

Fernández N, Renedo M, Alonso S, Crespo MS. Release of arachidonic acid by stimulation of opsonic receptors in human monocytes: the Fcγ₃R and the complement receptor 3 pathways. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26;278(52):52179-87.

Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, Vinolo E, Ku CL, Puel A, Frucht DM, Christel K, von Bernuth H, Jouanguy E, Feinberg J, Durandy A, Senechal B, Chappier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Fieschi C, Picard C, Garfa M, Chemli J, Bejaoui M, Tsolia MN, Kutukculer N, Plebani A, Notarangelo L, Bodemer C, Geissmann F, Israël A, Véron M, Knackstedt M, Barbouche R, Abel L, Magdorf K, Gendrel D, Agou F, Holland SM, Casanova JL. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1745-59.

Flad HD, Grage-Griebenow E, Petersen F, Scheuerer B, Brandt E, Baran J, Pryjma J, Ernst M. The role of cytokines in monocyte apoptosis. *Pathobiology*. 1999;67(5-6):291-3.

Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2009 May;7(5):355-66.

Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 2:S3.

Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Gao Y, DeLeo FR, Quinn MT. Role of NF-κ_B in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-α. *J Leukoc Biol*. 2007 Sep;82(3):729-41.

Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009 Mar;8(1):40-52.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010 Feb 5;327(5966):656-61.

Gerzer R, Radany EW, Garbers DL. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982 Sep 30;108(2):678-86.

Ginis I, Hallenbeck JM, Liu J, Spatz M, Jaiswal R, Shohami E. Tumor necrosis factor and reactive oxygen species cooperative cytotoxicity is mediated via inhibition of NF-κ_B. *Mol Med*. 2000 Dec;6(12):1028-41.

Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 2002 Dec 27;111(7):927-30.

Griffiths G, et al. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*. 1988 52:329-41.

Gupta R, Bajpai P, Tripathi LM, Srivastava VM, Jain SK, Misra-Bhattacharya S. Macrophages in the development of protective immunity against experimental *Brugia malayi* infection. *Parasitology*. 2004 Sep;129(Pt 3):311-23.

Haider AW, Roubenoff R, Wilson PW, Levy D, D'Agostino R, Silbershatz H, O'Donnell CJ. Monocyte cytokine production, systemic inflammation and cardiovascular disease in very elderly men and women: the Framingham Heart Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2004 Jun;11(3):214-5.

Hasui M, Hirabayashi Y, Kobayashi Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J Immunol Methods*. 1989 Feb 8;117(1):53-8.

He B, Weber GF. Phosphorylation of NF-kappaB proteins by cyclic GMP-dependent kinase. A noncanonical pathway to NF-kappaB activation. *Eur J Biochem*. 2003 May;270(10):2174-85.

Heydemann A, Juang G, Hennessy K, Parmacek MS, Simon MC. The myeloid-cell-specific c-fes promoter is regulated by Sp1, PU.1, and a novel transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr;16(4):1676-86.

Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Dec;18(12):484-91.

Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta*. 1982 Sep 17;718(1):49-59.

Jin C, Wu L, Li J, Fang M, Cheng L, Wu N. Multiple signaling pathways are involved in the interleukine-4 regulated expression of DC-SIGN in THP-1 cell line. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:357060.

Joerink M, Savelkoul HF, Wiegertjes GF. Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Mol Immunol*. 2006 Mar;43(8):1116-28.

Jurkowska M, Bernatowska E, Bal J. Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004 Mar-Apr;52(2):113-20.

Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Sep 30;1745(3):287-99.

Kang HB, Kim YE, Kwon HJ, Sok DE, Lee Y. Enhancement of NF-kappaB expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line SNUhES3. *Stem Cells Dev*. 2007 Aug;16(4):615-23.

Kinsman OS, White MI, Noble WC. Inflammatory reactions to staphylococcal protein A in mice. *Br J Exp Pathol*. 1981 Apr;62(2):142-5.

Kneidl J, Löffler B, Erat MC, Kalinka J, Peters G, Roth J, Barczyk K. Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. *Cell Microbiol*. 2012 Jun;14(6):914-36.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol*. 1998 Aug;113(2):147-56.

Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*. 2003 Oct 17;93(8):700-9.

Lee SM, Suen Y, Qian J, Knoppel E, Cairo MS. The regulation and biological activity of interleukin 12. *Leuk Lymphoma*. 1998 May;29(5-6):427-38.

Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:105-28.

Li CY, Chou TC, Wu CC, Wong CS, Ho ST, Yen MH, Ding YA. Dantrolene inhibits nitric oxide synthase in rat alveolar macrophages treated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Can J Anaesth*. 1998 Mar;45(3):246-52.

Lincoln JA, Lefkowitz DL, Cain T, Castro A, Mills KC, Lefkowitz SS, Moguilevsky N, Bollen A. Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. *Infect Immun*. 1995 Aug;63(8):3042-7.

Liu YC, Wu SN. BAY 41-2272, a potent activator of soluble guanylyl cyclase, stimulates calcium elevation and calcium-activated potassium current in pituitary GH cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 Dec;32(12):1078-87.

Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B, Chen Y. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Oct 1;13(7):1011-22.

Luengo-Blanco M, Prando C, Bustamante J, Aragão-Filho WC, Pereira PV, Rehder J, Padden C, Casanova JL, Newburger PE, Condino-Neto A. Essential role of nuclear factor-kappaB for NADPH oxidase activity in normal and anhidrotic ectodermal dysplasia leukocytes. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1453-60.

Ma X, Trinchieri G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv Immunol*. 2001;79:55-92.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323-50.

Mahbub-E-Sobhani, Haque N, Salma U, Ahmed A. Immune modulation in response to stress and relaxation. *Pak J Biol Sci.* 2011 Mar 15;14(6):363-74.

Majumdar S, Aggarwal BB. Adenosine suppresses activation of nuclear factor-kappaB selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene.* 2003 Feb 27;22(8):1206-18.

Małek R, Borowicz KK, Jargiełło M, Czuczwar SJ. Role of nuclear factor kappaB in the central nervous system. *Pharmacol Rep.* 2007 Jan-Feb;59(1):25-33.

Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M. Regulation of NADPH oxidase subunit p22(phox) by NF-kB in human aortic smooth muscle cells. *Arch Physiol Biochem.* 2007 Oct-Dec;113(4-5):163-72.

Marchetti C, Patriarca P, Solero GP, Baralle FE, Romano M. Genetic characterization of myeloperoxidase deficiency in Italy. *Hum Mutat* 2004;23:496-505.

Marin V, Montero-Julian FA, Grès S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G. The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3435-42.

Maródi L, Tournay C, Káposzta R, Johnston RB Jr, Mogueilevsky N. Augmentation of human macrophage candidacidal capacity by recombinant human myeloperoxidase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2750-4.

Martin E, Berka V, Sharina I, Tsai AL. Mechanism of binding of NO to soluble guanylyl cyclase: implication for the second NO binding to the heme proximal site. *Biochemistry.* 2012 Apr 3;51(13):2737-46.

Martin E, Czarnecki K, Jayaraman V, Murad F, Kincaid J. Resonance Raman and infrared spectroscopic studies of high-output forms of human soluble guanylyl cyclase. *J Am Chem Soc.* 2005 Apr 6;127(13):4625-31.

Mauch L, Lun A, O’Gorman MRG et al. Chronic Granulomatous Disease (CGD) and Complete Myeloperoxidase Deficiency Both Yield Strongly Reduced Dihydrorhodamine 123 Test Signals but Can Be Easily Discerned in Routine Testing for CGD. *Clin Chem.* 2007 53(5):890-6.

Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica.* 1995 Mar-Apr;80(2):161-75.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000;173:89–97.

Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000;8(10):452–6.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-45.

Meffert MK, Baltimore D. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci*. 2005 Jan;28(1):37-43.

Mellman I, Turley SJ, Steinman RM. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol*. 1998 Jun;8(6):231-7.

Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen YF, Oparil S. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation*. 2004 Sep 21;110(12):1664-9.

Moon DO, Kim MO, Lee JD, Choi YH, Kim GY. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Lett*. 2010 Feb 28;288(2):183-91.

Morbideilli L, Pyriochou A, Filippi S, Vasileiadis I, Roussos C, Zhou Z, Loutrari H, Waltenberger J, Stössel A, Giannis A, Ziche M, Papapetropoulos A. The soluble guanylyl cyclase inhibitor NS-2028 reduces vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and permeability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 Mar;298(3):R824-32.

Mühl H, Pfeilschifter J. Endothelial nitric oxide synthase: a determinant of TNFalpha production by human monocytes/macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Oct 24;310(3):677-80.

Naderi beni F, Fattahi F, Mirshafiey A, Ansari M, Mohsenzadegan M, Movahedi M, Pourpak Z, Moin M. Increased production of nitric oxide by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease on interferon-gamma treatment. *Int Immunopharmacol*. 2012 Apr;12(4):689-93.

Naumann M. Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. *Biochem Pharmacol*. 2000 Oct 15;60(8):1109-14.

Nauseef WM, Cogley M, McCormick S. Effect of the R569W missense mutation on the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem*. 1996;271:9546-9.

Netea MG, Kullberg BJ, van der Meer JW. Severely impaired IL-12/IL-18/IFNgamma axis in patients with hyper IgE syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2005 Nov;35(11):718-21.

Nguyen LN, Nguyen TG. Characteristics and outcomes of multiple organ dysfunction syndrome among severe-burn patients. *Burns*. 2009 Nov;35(7):937-41.

Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med*. 1996 May 1;183(5):2293-302.

Nickel D, Busch M, Mayer D, Hagemann B, Knoll V, Stenger S. Hypoxia triggers the expression of human β defensin 2 and antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *J Immunol*. 2012 Apr 15;188(8):4001-7.

Niska JA, Meganck JA, Pribaz JR, Shahbazian JH, Lim E, Zhang N, Rice BW, Akin A, Ramos RI, Bernthal NM, Francis KP, Miller LS. Monitoring Bacterial Burden, Inflammation and Bone Damage Longitudinally Using Optical and μ CT Imaging in an Orthopaedic Implant Infection in Mice. *PLoS One*. 2012;7(10):e47397.

Ohlstein EH, Wood KS, Ignarro LJ. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys*. 1982 Oct 1;218(1):187-98.

Pedraza-Sánchez S, Herrera-Barrios MT, Aldana-Vergara R, Neumann-Ordoñez M, González-Hernández Y, Sada-Díaz E, de Beaucoudrey L, Casanova JL, Torres-Rojas M. Bacille Calmette-Guérin infection and disease with fatal outcome associated with a point mutation in the interleukin-12/interleukin-23 receptor beta-1 chain in two Mexican families. *Int J Infect Dis*. 2010 Sep;14 Suppl 3:e256-60.

Pereira PVS. BAY 41-2272: um imunomodulador com potencial para o controle de infecções. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980;38(1-2):161-70.

Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. 1981;46(2):211-26.

Pinello KC, Fonseca Ede S, Akisue G, Silva AP, Salgado Oloris SC, Sakai M, Matsuzaki P, Nagamine MK, Palermo Neto J, Dagli ML. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. *Life Sci*. 2006 Feb 16;78(12):1287-92.

Podrez EA, Hoppe G, O'Neil J, Sayre LM, Sheibani N, Hoff HF. Macrophage receptors responsible for distinct recognition of low density lipoprotein containing pyrrole or pyridinium adducts: models of oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2000 Sep;41(9):1455-63.

Pontremoli S, Melloni E. The role of calpain and protein kinase C in activation of human neutrophils. *Prog Clin Biol Res*. 1988;282:195-208.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(2):331-8.

Qu HQ, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Molecular immunity to mycobacteria: knowledge from the mutation and phenotype spectrum analysis of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Int J Infect Dis.* 2011 May;15(5):e305-13.

Rabinovitch M, Manejias RE, Russo M, Abbey EE. Increased spreading of macrophages from mice treated with interferon inducers. *Cell Immunol.* 1977 Mar 1;29(1):86-95.

Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature.* 1983 Nov 10-16;306(5939):174-6.

Rebecchi IM, Ferreira Novo N, Julian Y, Campa A. Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient. *Cell Biochem Funct.* 2000 Jun;18(2):127-32.

Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1->3)-beta-D-glucans. *J Leukoc Biol.* 2002 Jul;72(1):140-6.

Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun.* 1998 Nov;66(11):5314-21.

Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grötzinger J, Seegert D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* 2007 May;11(5):613-24.

Rosmarin AG, Luo M, Caprio DG, Shang J, Simkevich CP. Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (beta2 leukocyte integrin) promoter. *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):13097-103.

Ross GD, Větvicka V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol.* 1993 May;92(2):181-4.

Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(5):379-446.

Roy A, Fung YK, Liu X, Pahan K. Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *J Biol Chem.* 2006 May 26;281(21):14971-80.

Schaer CA, Vallelian F, Imhof A, Schoedon G, Schaer DJ. CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *J Leukoc Biol.* 2007 Jul;82(1):106-10.

Schmidt EP, Damarla M, Rentsendorj O, Servinsky LE, Zhu B, Moldobaeva A, Gonzalez A, Hassoun PM, Pearse DB. Soluble guanylyl cyclase contributes to ventilator-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Dec;295(6):L1056-65.

Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-52.

Siednienko J, Halle A, Nagpal K, Golenbock DT, Miggin SM. TLR3-mediated IFN- β gene induction is negatively regulated by the TLR adaptor MyD88 adaptor-like. *Eur J Immunol*. 2010 Nov;40(11):3150-60.

Siednienko J, Maratha A, Yang S, Mitkiewicz M, Miggin SM, Moynagh PN. Nuclear factor κ B subunits RelB and cRel negatively regulate Toll-like receptor 3-mediated β -interferon production via induction of transcriptional repressor protein YY1. *J Biol Chem*. 2011 Dec 30;286(52):44750-63.

Soeiro-Pereira PV, Falcai A, Kubo CA, Oliveira-Júnior EB, Marques OC, Antunes E, Condino-Neto A. BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase agonist, activates human mononuclear phagocytes. *Br J Pharmacol*. 2012 Jul;166(5):1617-30.

Son YH, Jeong YT, Lee KA, Choi KH, Kim SM, Rhim BY, Kim K. Roles of MAPK and NF- κ B in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Jan;51(1):71-7.

Stjernberg-Salmela S, Ranki A, Karenko L, Siitonen S, Mustonen H, Puolakkainen P, Sarna S, Pettersson T, Repo H. Low TNF-induced NF- κ B and p38 phosphorylation levels in leucocytes in tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Feb;49(2):382-90.

Stuart LM, Bell SA, Stewart CR, Silver JM, Richard J, Goss JL, Tseng AA, Zhang A, El Khoury JB, Moore KJ. CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27392-401.

Sung SS. Monocyte-derived dendritic cells as antigen-presenting cells in T-cell proliferation and cytokine production. *Methods Mol Med*. 2008;138:97-106.

Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006;211, 609-18.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335–376.

Tamion F, Richard V, Lyoumi S, Hiron M, Bonmarchand G, Leroy J, Daveau M, Thuillez C, Lebreton JP. Induction of haem oxygenase contributes to the synthesis of pro-inflammatory cytokines in re-oxygenated rat macrophages: role of cGMP. *Cytokine*. 1999 May;11(5):326-33.

Tatefuji T, Izumi N, Ohta T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol Pharm Bull.* 1996 Jul;19(7):966-70.

Thiele A, Kronstein R, Wetzel A, Gerth A, Nieber K, Hauschildt S. Regulation of adenosine receptor subtypes during cultivation of human monocytes: role of receptors in preventing lipopolysaccharide-triggered respiratory burst. *Infect Immun.* 2004 Mar;72(3):1349-57.

Thorsen LB, Eskildsen-Helmond Y, Zibrandtsen H, Stasch JP, Simonsen U, Laursen BE. BAY 41-2272 inhibits the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Eur J Pharmacol.* 2010 Nov 25;647(1-3):147-54.

Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Dec;51(3):443-52.

Turvey SE, Hawn TR. Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections. *Clin Immunol* 2006;120:1–9.

Unanue ER, Allen PM. Biochemistry and biology of antigen presentation by macrophages. *Cell Immunol.* 1986 Apr 15;99(1):3-6

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998 Sep 11;281(5383):1680-3.

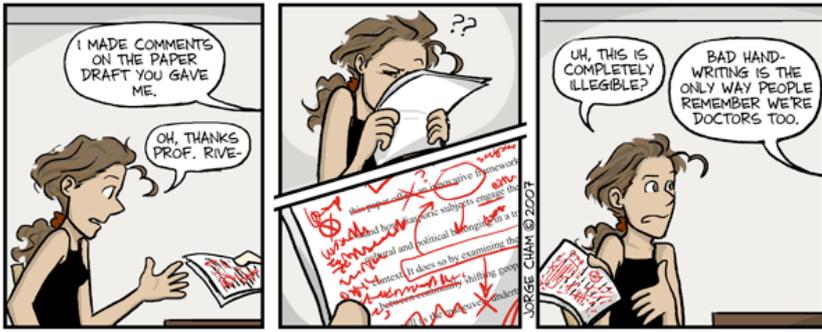
Wang H, Zhong F, Pan J, Li W, Su J, Huang ZX, Tan X. Structural and functional insights into the heme-binding domain of the human soluble guanylate cyclase α_2 subunit and heterodimeric $\alpha_2\beta_1$. *J Biol Inorg Chem.* 2012 Jun;17(5):719-30.

Xiao W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol.* 2004 Dec;1(6):425-35.

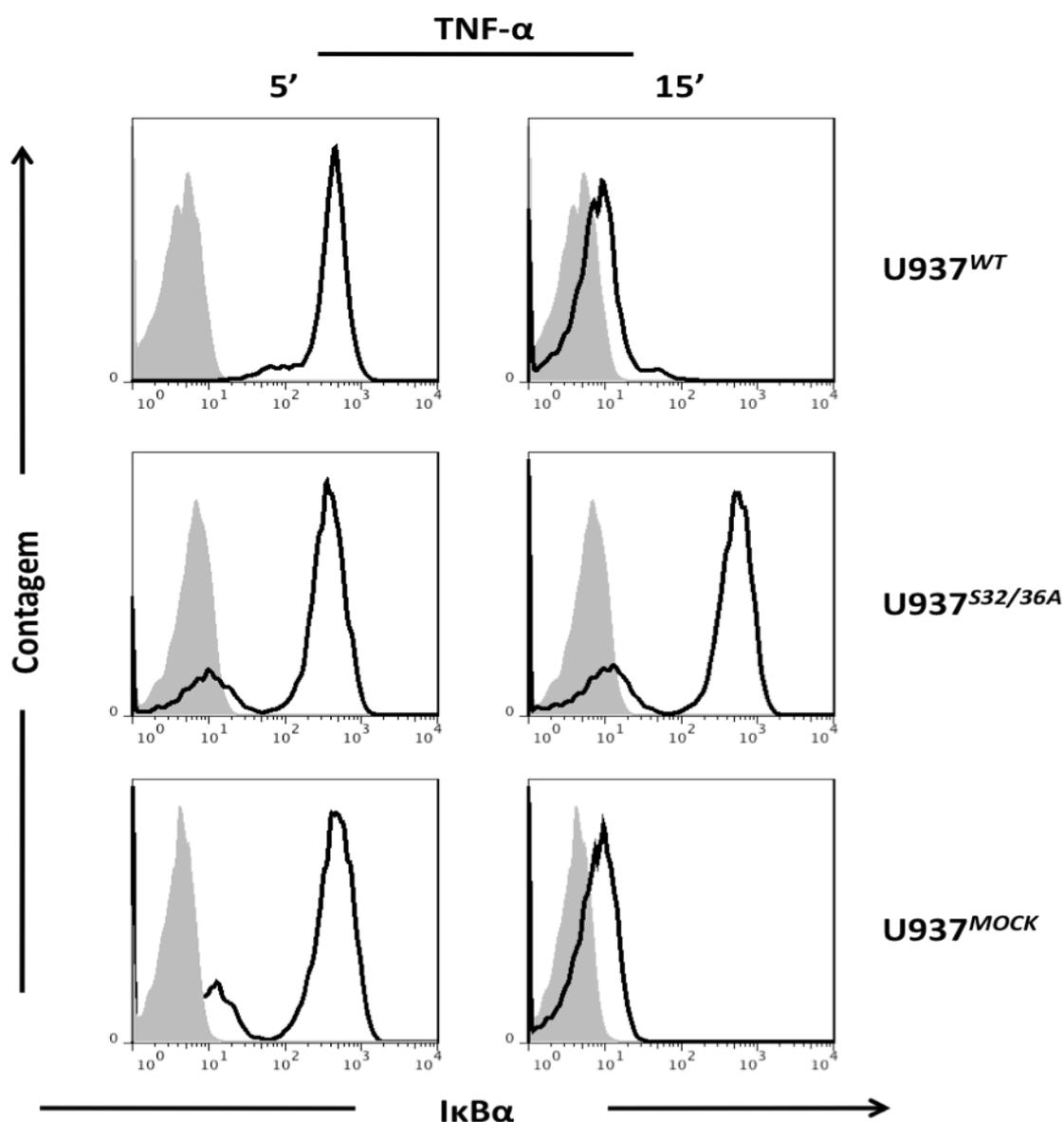
Yang Z, Wara-Aswapati N, Chen C, Tsukada J, Auron PE. NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether. *J Biol Chem.* 2000 Jul 14;275(28):21272-7.

Yoshida K, Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G. Effect of proinflammatory cytokines on cultured spiral ligament fibrocytes. *Hear Res.* 1999 Nov;137(1-2):155-9.

Zhou MJ, Poo H, Todd RF 3rd, Petty HR. Surface-bound immune complexes trigger transmembrane proximity between complement receptor type 3 and the neutrophil's cortical microfilaments. *J Immunol.* 1992 Jun 1;148(11):3550-3.

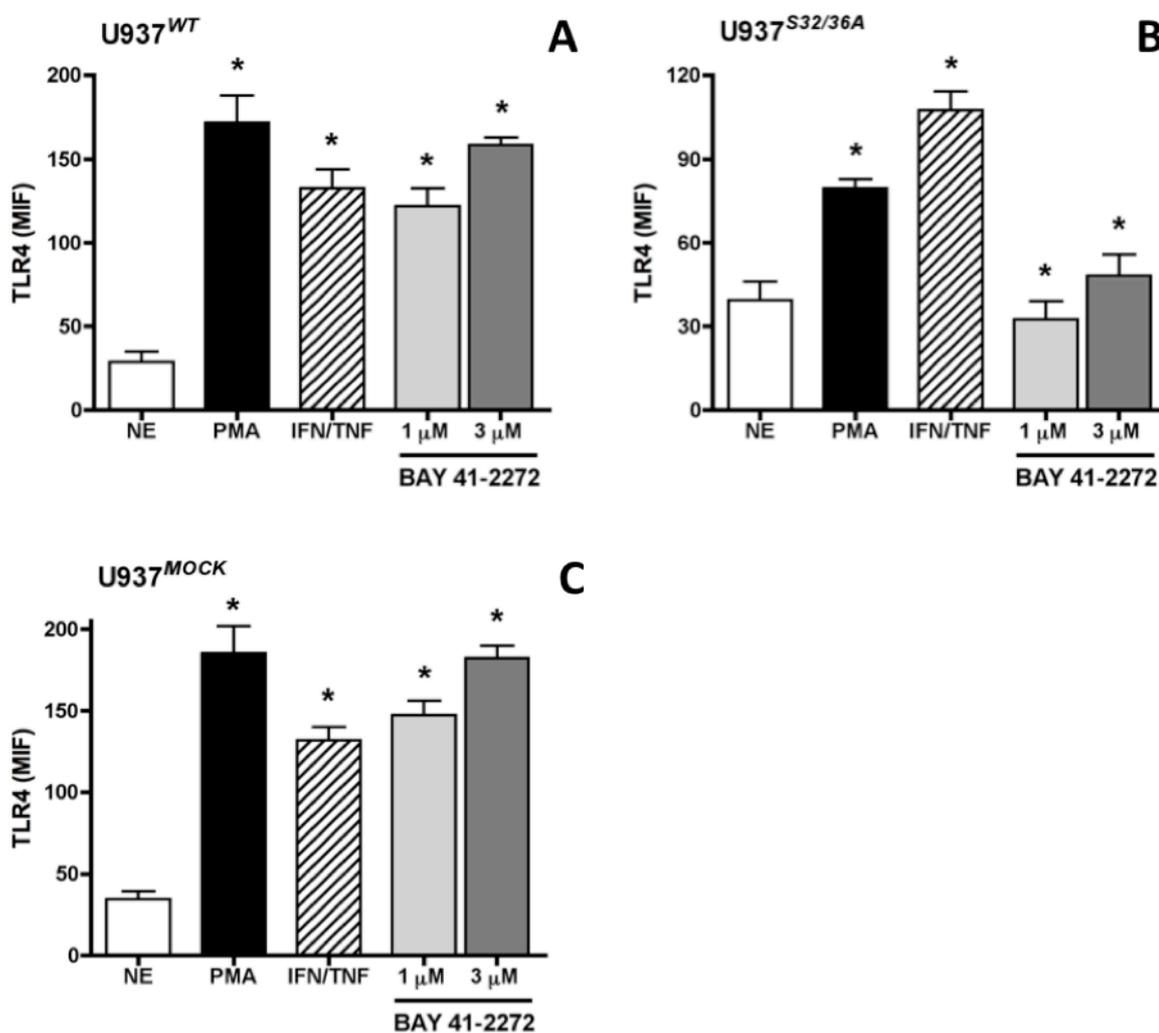


APÊNDICE A - Degradação de I κ B α em células U937 selvagens e com vetor contendo I κ B α mutado



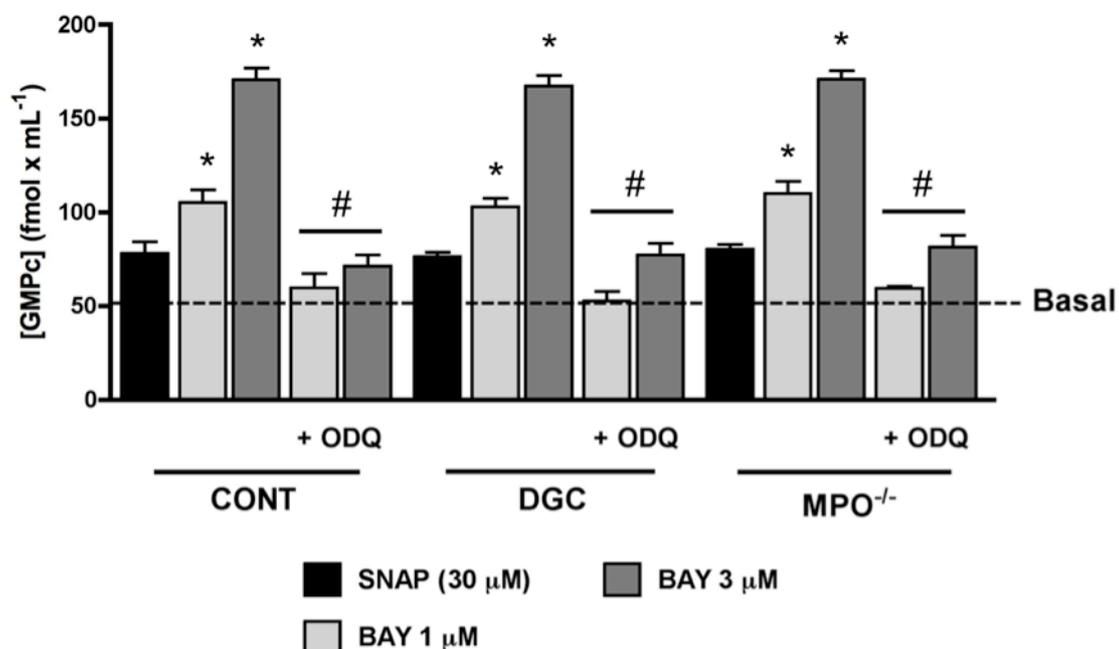
As células U937 selvagens (WT), com vetor contendo I κ B α mutado ou contendo vetor vazio (1×10^6) foram tratadas por 5 e 15 minutos com TNF- α (1000 U/mL). Após tratamento, as células foram permeabilizadas e marcadas para avaliação da expressão de I κ B α por citometria de fluxo. A figura representa a degradação do I κ B α baseada na diminuição de sua marcação. Em cinza, as células não marcadas. A linha preta representa a marcação para o I κ B α em cada tipo celular e em cada tempo de tratamento.

APÊNDICE B - Expressão de TLR4 em células U937 *knockdown* para NF- κ B



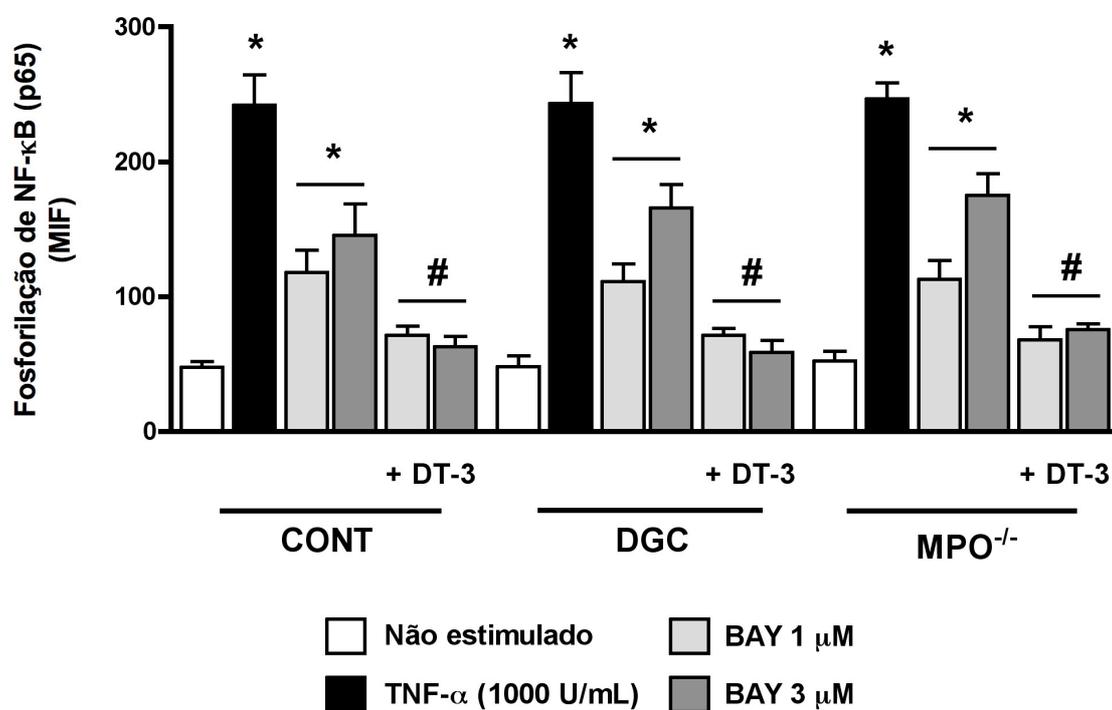
As células U937 (1×10^6) selvagens (A), *knockdown* para NF- κ B (B) e com vetor vazio (C) foram tratadas por 48 horas com PMA (100 nM), IFN- γ (100 U/mL) associado a TNF- α (1000 U/mL) (IFN/TNF) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células foram marcadas para avaliação da expressão de TLR4 por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm s.e.m, (n = 5 experimentos, em triplicata). * para ANOVA, $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

APÊNDICE C - Função da Guanilato Ciclase Solúvel em monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO



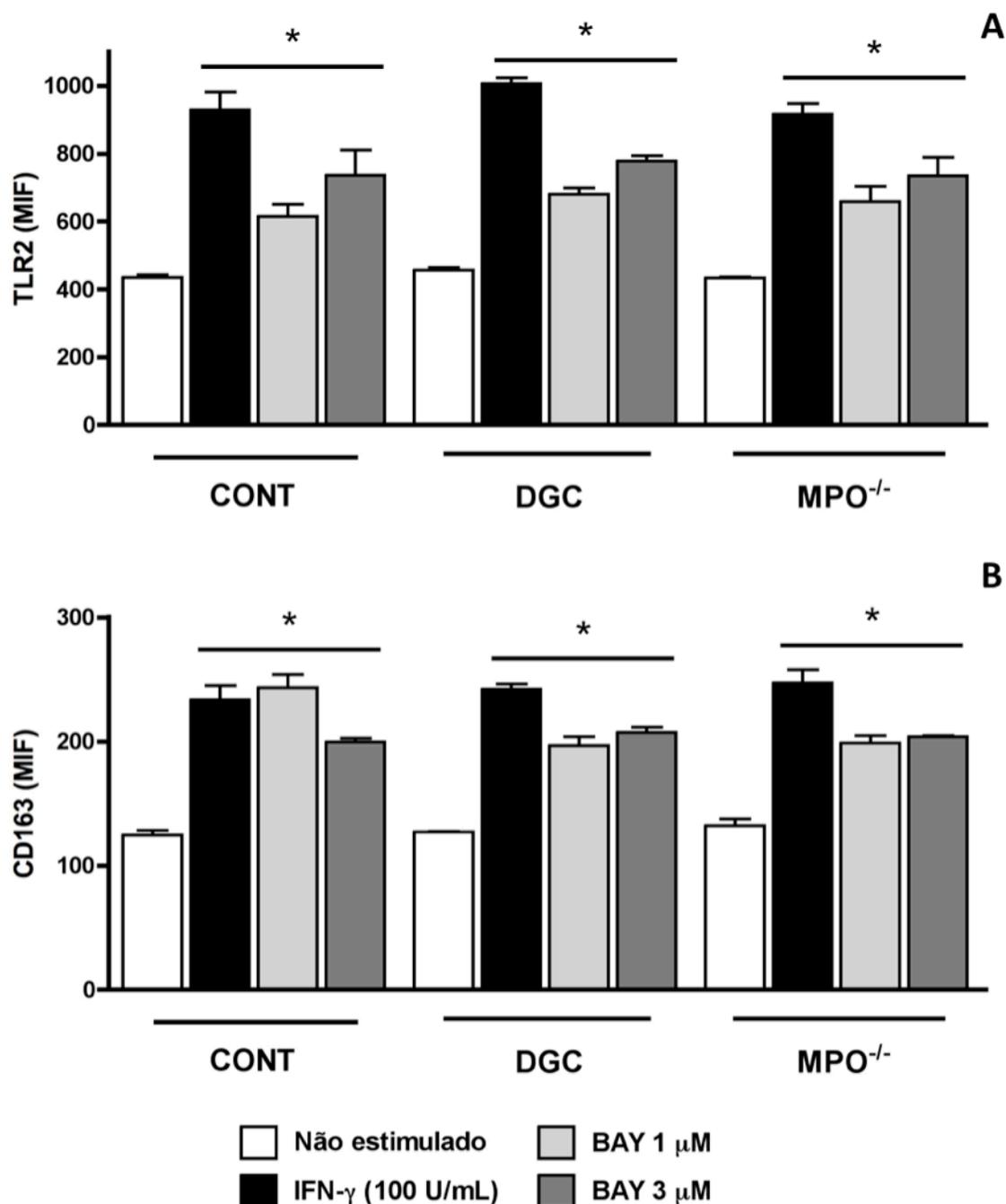
Efeito do BAY 41-2272 sobre os níveis intracelulares de GMPc, com inibição específica por ODQ, em células PBM de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC) ou deficiência de mieloperoxidase (MPO^{-/-}). As suspensões celulares (5×10^5 células/mL) foram incubadas com doador de óxido nítrico SNAP (30 μM) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μM), associados ou não ao ODQ (100 μM). Resultados representam média \pm s.e.m. da concentração de GMPc (fmol/mL) (n= 7 indivíduos controles, 2 pacientes com DGC e 2 pacientes com MPO^{-/-}, em triplicata). * para ANOVA p<0,05 em relação à produção basal média de GMPc (linha tracejada).

APÊNDICE D - Ativação de NF- κ B, dependente de PKG, em monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO



Os PBM (1×10^6) de pacientes com DGC ou deficiência de MPO foram TNF- α (1000 U/mL, por 15 minutos) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M, por 60 minutos). Após tratamento, as células foram permeabilizadas e marcadas para avaliação da expressão de NF- κ B (p65) fosforilado (pS529) por citometria de fluxo. Os resultados expressam média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm s.e.m, (n= 7 indivíduos controles, 2 pacientes com DGC e 2 pacientes com MPO^{-/-}, em triplicata). * para ANOVA, $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE); # para ANOVA, $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo não tratado com os inibidores. DT-3: inibidor de PKG.

APÊNDICE E - Expressão de TLR2 e CD163 em monócitos de pacientes com DGC e deficiência de MPO



Os PBM (1×10^6) de pacientes com DGC ou deficiência de MPO (MPO^{-/-}) foram tratados por 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) ou BAY 41-2272 (1 ou 3 μ M). Após tratamento, as células foram marcadas para avaliação da expressão de TLR4 (A) e CD163 (B) por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm s.e.m, (n= 7 indivíduos controles, 2 pacientes com DGC e 2 pacientes com MPO^{-/-}, em triplicata). * para ANOVA, $p < 0,05$ em relação ao controle não estimulado (NE).

APÊNDICE F - Soeiro-Pereira PV, Falcai A, Kubo CA, Oliveira-Júnior EB, Marques OC, Antunes E, Condino-Neto A. BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase agonist, activates human mononuclear phagocytes. Br J Pharmacol. 2012 Jul;166(5):1617-30.