

**PAULO VÍTOR SOEIRO PEREIRA**

**BAY 41-2272: um imunomodulador com potencial para  
o controle de infecções**

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

São Paulo  
2008

PAULO VÍTOR SOEIRO PEREIRA

**BAY 41-2272: um imunomodulador com potencial para o controle de infecções**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

São Paulo  
2008

\* As tiras em quadrinhos reproduzidas nesta dissertação, foram autorizadas pelo autor, Jorge Cham, desde que indicada a fonte ([www.phdcomics.com](http://www.phdcomics.com)).

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: um imunomodulador com potencial para o controle de infecções / Paulo Vítor Soeiro Pereira. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Antonio Condino Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia aplicada, biologia molecular, farmacologia, inflamação.

Versão do título para o inglês: BAY 41-2272: potential immunomodulator to control infections.

Descritores: 1. Biologia 2. Biologia Celular 3. Imunologia celular I. Condino Neto, Antonio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB146/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Paulo Vítor Soeiro Pereira.

Título da Dissertação: BAY 41-2272: um imunomodulador com potencial para o c  
De infecções.

Orientador(a): Antonio Condino Neto.

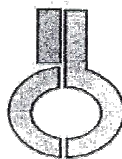
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

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

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Amando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - esp. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 17 de outubro de 2006.

**PARECER 751/CEP**


Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em 69ª Reunião realizada em 11.10.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Efeito do Bay 41-2272 e doadores de Oxido Nitrico sobre o desenvolvimento e regulação do Sistema NADPH-Oxidase na Linhagem Mielomonocítica Humana"*.

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

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

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

Dedico este trabalho...

...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.

...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.

...Aos meus irmãos, Ana Marina e Leonardo (Léo), por todos os momentos de convivência (apesar de cada vez mais raros) e palavras e gestos de apoio nos momentos que precisei.

...Aos meus avós, que foram sempre alicerce para todas as 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 Angela...

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

...pelo conforto e carinho nos momentos de angústia e que me fazem tão bem.

...pela sua companhia que me deu forças nos momentos difíceis e me motivaram a continuar sempre.

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

...pelo maior presente que poderia receber em toda minha vida, nosso filho Paulo Gabriel.

Obrigado por tudo!!! Amo-te!!!

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto pela dedicação ao ensino, à pesquisa e pela orientação segura e paciente que possibilitou a realização deste trabalho... Por acreditar que três garotos vindos de longe poderiam 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, Rosana Rezende e Silvana Lucchini, pela amizade constante, ajuda, carinho e cuidado sempre presentes. E por todos os ensinamentos técnicos e pessoais possíveis e imagináveis.

...Josias e Walmir, amigos desde faculdade, companheiros de todos os momentos, cuja a amizade e companheirismo estarão sempre ao meu lado.

...Julieta e Rafael, que com suas brincadeiras sempre alegram todos ao seu redor e cuja companhia pude contar da mesma forma nos momentos de dificuldade, quanto na alegria.

...Otávio, Paolo, Dora, Stefanie, amigos sempre dispostos a auxiliar e por todos os momentos de convívio e paciência.

...todos do laboratório de Campinas, principalmente Edgar (Mister Ed.), Patrícia (Patty) e Jussara (Ju), pela companhia, brincadeiras, viagens (para novos lugares e sem sair do lugar) e todos os ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

A todas as “meninas” do Laboratório de Imunologia de Mucosas que nos acolheram de forma tão carinhosa. Muito obrigado pelo auxílio experimental, “psicológico” e pela grande amizade.

À Dra. Gerlândia Neres Pontes, pelo auxílio tanto na execução dos experimentos quanto nas discussões dos resultados, suporte para realização deste trabalho.

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.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Calich e ao Prof. Dr. Marcelo De Franco, pela colaboração na análise e confecção deste trabalho, como também na minha formação como professor e pesquisador.

À Profa. Dra. Ana Campa, que abriu as portas de seu laboratório e me propiciou a possibilidade de grande conhecimento profissional, e que junto com todos os seus alunos, principalmente a Sabrina, me fizeram sentir à vontade todas as vezes que aí estive.



Aos funcionários da secretaria do Departamento de Imunologia: Jotelma, Amarildo, Amanda e Eni, pelo desempenho e dedicação em todos os momentos em que precisei.

Aos companheiros pós-graduandos de todos os andares e laboratórios, pelo apoio, auxílio, happy hours na copinha, idas ao “frango” e amizade construída.

Aos eternos amigos e “irmãos” Lúcio Flávio, Thiago e Luís Carlos, pela inesquecível convivência, pelos momentos e pela criatividade contagiante com que levam o dia a dia.

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

À amiga Michelle Fonseca, pelo grande apoio, principalmente no início desta caminhada.

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

À FAPESP, pela Bolsa de Mestrado e Auxílio concedido a este trabalho (processo n° 06/51002-2).

E a todos, aqui não citados, que de alguma forma contribuíram para realização 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: um imunomodulador com potencial para o controle de infecções [Dissertação Mestrado em Imunologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

A ativação dos fagócitos é um ponto crítico para a defesa contra vários patógenos. Defeitos nos componentes do Sistema NADPH oxidase, gerador dos reativos de oxigênio, desabilitam os fagócitos de destruir e processar microorganismos englobados pela ação desses reativos. Por isso a importância de estudos que desenvolvam alternativas para a ativação dessas células. BAY 41-2272, um fármaco ativador de Guanilato Ciclase solúvel, em um sítio heme dependente, consegue estimular a produção de cGMP, uma importante molécula sinalizadora intracelular. Oliveira-Junior e colaboradores (2007) mostraram o efeito desse fármaco na indução da produção de superóxido por células THP-1, uma linhagem pró-monocítica humana. Nosso estudo visou investigar os efeitos do BAY 41-2272 na ativação de fagócitos de sangue periférico. Para este propósito avaliamos a liberação de superóxido, fagocitose, atividade microbicida, produção de citocinas e expressão gênica das células tratadas com o fármaco em questão. Foram usados PBMC, neutrófilos e a linhagem celular THP-1 que receberam ou não o tratamento em cultura com BAY 41-2272 (1  $\mu$ M ou 3  $\mu$ M), de forma aguda, por 1h, ou crônica, por, 48h a 37 °C. A liberação de ânion superóxido foi avaliada pelo ensaio da redução do citocromo *c* inibido especificamente pela superóxido dismutase; a fagocitose foi analisada através da co-cultura com partículas de Zymosan e contagem das células com partículas englobadas; a atividade microbicida foi mensurada por meio da co-cultura com *E. coli* enteropatogênica seguida pela contagem das CFU formadas pelas bactérias recuperadas dos fagócitos; a dosagem das citocinas foi realizada pelo método de ELISA; e a expressão do gene *CYBB*, codificador da gp91<sup>phox</sup> – um dos principais componentes da NADPH oxidase – por PCR em tempo real. Todos os tipos celulares responderam aos tratamentos. Os PBMC, neutrófilos e THP-1 tratados com BAY 41-2272 produziram significativamente mais superóxido (cerca de 50% mais), e apresentaram atividade fagocítica significativamente maior (cerca de 54% mais) do que o grupo controle. Conseqüentemente houve um aumento na atividade microbicida (cerca do dobro). O BAY 41-2272 também induziu a liberação de TNF- $\alpha$  por todas células testadas e aumentou a expressão do gene *CYBB* que codifica a proteína gp91<sup>phox</sup> nas células THP-1 e PBMC. Este fármaco, especialmente na dose de 3  $\mu$ M, ativou fagócitos em todos os aspectos avaliados. Esses efeitos serão explorados em seus aspectos translacionais na busca por novas terapias destinadas ao controle de infecções, principalmente no caso das imunodeficiências.

**Palavras-chave:** BAY 41-2272; Fagócitos; Atividade Microbicida; Expressão gênica; NADPH oxidase.

## ABSTRACT

Pereira PVS. BAY 41-2272: a potential immunomodulator to control infections [Master thesis Immunology]. São Paulo: Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo; 2008.

Phagocytes activation is critical for the host defense against pathogens. Molecular defects affecting the NADPH oxidase system, generator of reactive oxygen species, impair these cells to destroy and process ingested microorganisms. Thus it is important to perform new studies regarding the development of alternative pathways to activate these cells. BAY 41-2272, a heme dependent soluble Guanylate Cyclase activator, stimulate cGMP production, an important intracellular signaling molecule. Oliveira-Junior et al. (2007) showed that this drug induces superoxide production by THP-1 cells, a pro-monocyte human cell lineage. Our study aimed to investigate the effects of BAY 41-2272 on the activation of peripheral human blood phagocytes. For this purpose we evaluated superoxide release, phagocytosis, microbicidal activity, cytokines production, and gene expression of cells treated with BAY 41-2272. PBMC, neutrophils and THP-1 cells received or not acute (1h) and chronic (48h) treatment with BAY 41-2272 (1  $\mu$ M or 3  $\mu$ M). The superoxide release was evaluated by the superoxide dismutase specifically inhibitable cytochrome c reduction assay; phagocytosis was examined by co-culture with Zymosan followed by counting of ingested particles, microbicidal activity was measured by co-culture with enteropathogenic *E. coli* followed by counting CFU by recovered bacteria from phagocytes, cytokines release were assayed by ELISA, and the gene expression of gp91<sup>phox</sup> encoder *CYBB* – one of the main components of NADPH oxidase – was performed by real-time PCR. All cell types responded to BAY 41-2272 treatment. PBMC, neutrophils, and THP-1 treated with BAY 41-2272 produced significantly more superoxide (about 50% more), and had a significantly higher phagocytosis (around 54% more) than the control group. Consequently there was an increase of microbicidal activity (approximately double). The treatments also induced cells to release TNF- $\alpha$ . *CYBB* expression increased in THP-1 and PBMC. BAY 41-2272, especially at 3  $\mu$ M, showed great potential on phagocyte activation, in all evaluated aspects. This potential can be further investigated in the search for new therapies controlling infections, particularly in patients with immunodeficiencies.

**Key words:** BAY 41-2272; Phagocytes; Microbicidal Activity; Gene expression; NADPH oxidase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b> Componentes do Sistema NADPH oxidase..	26
<b>FIGURA 2:</b> Domínios das proteínas da oxidase de fagócitos ..	29
<b>FIGURA 3:</b> Vias de transferência de elétrons dentro do flavocitocromo <i>b</i> <sub>558</sub> .....	30
<b>FIGURA 4:</b> Vias de transdução de sinal do TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ . ..	34
<b>FIGURA 5:</b> Vias de transdução de sinal do cGMP e cAMP.....	36
<b>FIGURA 6:</b> Estrutura do BAY 41-2272. ....	37
<b>FIGURA 7:</b> DMSO não induz espraiamento das THP-1, PBMC e neutrófilos. ....	59
<b>FIGURA 8:</b> BAY 41-2272 induz o espraiamento.....	60
<b>FIGURA 9:</b> BAY 41-2272 induz a produção de ânion superóxido por PBMC e neutrófilos.....	61
<b>FIGURA 10:</b> BAY 41-2272 induz o aumento da atividade fagocítica de células THP-1, PBMC e neutrófilos. ....	62
<b>FIGURA 11:</b> BAY 41-2272 aumenta a atividade fagocítica.....	63
<b>FIGURA 12:</b> BAY 41-2272 aumenta a capacidade microbicida de PBMC e células THP-1.....	64
<b>FIGURA 13:</b> BAY 41-2272 aumenta a expressão do gene <i>CYBB</i> em PBMC e THP-1..	66

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Anticorpos utilizados em cada tubo. ....	44
<b>TABELA 2:</b> Opsonização das EPEC. ....	50
<b>TABELA 3:</b> Fagocitose das EPEC.....	51
<b>TABELA 4:</b> REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA – REAGENTES E CICLOS USADOS. ....	54
<b>TABELA 5:</b> Genes e primers para avaliação por Real Time PCR.....	54
<b>TABELA 6:</b> Reação de PCR em tempo real.....	55
<b>TABELA 7:</b> Valores das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ no sobrenadante das culturas .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AS	Angeli's salt
ATP	Adenosina Trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ERO	Espécies Reativas De Oxigênio
FcγR	Receptor da Região Fc do Anticorpo IgG
fMLP	N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel
GSF	Fator estimulador de colônia
GM-GSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Monócitos
GMP	Guanilato Monofosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
IFN-γ	Interferon Gama
IκB	Inhibitor of NF-κB Kinase
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12Rβ2	Receptor β2 de Interleucina 12
IRAKs	IL-1 Receptor-associated Kinases IFN-γ
IRF3	Fator Regulador de Interferon 3
JNK	Jun N-terminal quinase
LBP	Proteína ligadora de LPS
L-NMMA	NG-monometil-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B4

MØ	Macrófago
M-GSF	Fator Estimulador de Colônia de Monócitos
MHC	Complexo Principal de histocompatibilidade
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA Mensageiro
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF-kB	Fator Nuclear kB
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NOS	Enzima Sintetizadora de Óxido Nítrico
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion Superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PKA	Proteína Kinase A
PKC	Proteína Kinase C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PMA	Forbol Miristato Acetato
PMN	Leucócitos polimorfonucleares, Neutrófilos
RNA	Ácido Ribonucléico
SOD	Superóxido Dismutase
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 IMUNIDADE INATA</b> .....	18
<b>1.2 FAGÓCITOS</b> .....	20
<b>1.3 MECANISMOS DE ELIMINAÇÃO DE PATÓGENOS</b> .....	23
<b>1.4 SISTEMA NADPH OXIDASE</b> .....	26
<b>1.5 DEFICIÊNCIA DE FAGÓCITOS</b> .....	30
<b>1.6 TRATAMENTOS</b> .....	32
<b>1.7 VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS</b> .....	34
<b>1.8 BAY 41-2272</b> .....	37
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>3.1 NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO</b> .....	43
3.1.1 Obtenção das células do sangue periférico .....	43
3.1.2 Isolamento dos monócitos aderentes das culturas de PBMC .....	43
3.1.3 Imunofenotipagem dos PMN para molécula de CD16 .....	43
<b>3.2 LINHAGEM THP-1</b> .....	44
<b>3.3 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS</b> .....	44
<b>3.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM DMSO E BAY</b> .....	45
<b>3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR PELO ESPRAIAMENTO</b> .....	46
<b>3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO</b> .....	46
<b>3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA</b> .....	47
<b>3.8 AVALIAÇÃO DA FAGOCITOSE E ATIVIDADE BACTERICIDA</b> .....	48
3.8.1 Linhagem de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) e padronização da concentração bacteriana .....	48
3.8.2 Obtenção do material opsonizante e dosagem de anticorpos .....	48
3.8.3 Opsonização e fagocitose das EPEC .....	50
<b>3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS</b> .....	52
<b>3.10 EXPRESSÃO GÊNICA DA GP91<sup>PHOX</sup></b> .....	53
3.10.1 Extração do RNA Total .....	53
3.10.2 Transcrição Reversa .....	53
3.10.3 PCR em tempo real .....	54
<b>3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	56
<b>4 RESULTADOS</b> .....	57
<b>4.1 EFEITO DO DMSO E BAY 41-2272 SOBRE O ESPRAIAMENTO</b> .....	58
<b>4.2 EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO</b> .....	61
<b>4.3 EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A FAGOCITOSE</b> .....	62
<b>4.4 EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A ATIVIDADE MICROBICIDA</b> .....	64
<b>4.5 EFEITO DO BAY 41-2272 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS</b> .....	65
<b>4.6 EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A EXPRESSÃO DE GP91<sup>PHOX</sup></b> .....	66
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	67
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	82
<b>ANEXOS</b> .....	97



JORGE CHAM © 2008

WWW.PHDCOMICS.COM

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMUNIDADE INATA

O sistema imune tem sido tradicionalmente classificado em componentes inatos e adaptativos, cada qual com diferentes vias e funções. Os componentes adaptativos são organizados em torno de duas classes de células especializadas, linfócitos T e B. Cada linfócito dispõe de um único tipo de receptor, mas o repertório de receptores de antígenos na população inteira é muito grande e extremamente diverso (Fearon e Locksley, 1996). O tamanho e diversidade deste repertório aumentam a probabilidade de um linfócito individual encontrar um antígeno que se ligue ao seu receptor, recebendo os sinais necessários para sua ativação e proliferação. Este processo, chamado de seleção clonal, é uma das propriedades básicas do sistema imune adaptativo (Medzhitov e Janeway, 1997).

A expansão clonal frente a uma resposta a infecção é absolutamente necessária para a geração de uma resposta imune eficiente. De qualquer modo, essa resposta leva de três a cinco dias para produzir um número suficiente de clones que serão então diferenciados em células efetoras (Ezekowitz e Hoffman, 1998), o que é tempo mais do que suficiente para o patógeno causar danos ao hospedeiro. Em contrapartida, os mecanismos efetores da imunidade inata, incluindo fagócitos, peptídeos microbicidas e componentes do sistema complemento, são ativados imediatamente após a infecção e controlam rapidamente a replicação do patógeno infectante (Salyers e Whitt, 1994). Por esta razão, conter a infecção antes da ativação dos linfócitos foi considerado por muito tempo a função principal da imunidade inata. De qualquer modo, hoje considera-se que o sistema imune inato possui muito mais importância e vias fundamentais na defesa do organismo (Zhang, et al., 2000).

Em relação ao componente humoral da resposta imune inata, o sistema complemento constitui uma das principais defesas do organismo. Esse sistema é composto por um conjunto de proteínas, solúveis e de superfícies celulares, que participam não só de funções imunes importantes, como na resposta inflamatória, mas também da manutenção do funcionamento fisiológico normal do organismo. Estas proteínas plasmáticas do complemento estão sob a forma de precursores inativos que são ativados por proteólise limitada. Esses precursores geram

proteases que clivam as cadeias polipeptídicas dos componentes seguintes das vias gerando uma ativação em cadeia do sistema. Na resposta inata a ativação do complemento se dá pela via alternativa (Morgan, 1990; Farries e Atkinson, 1991). Os estímulos que ativam esse sistema encontram-se em todo o organismo, no entanto há um controle estrito por proteínas reguladoras, evitando o dano potencial ao próprio organismo e o desgaste desmedido dos componentes da via ativada. No caso do sistema imune inato, a via de ativação é a chamada via alternativa (Janeway, et al., 2001).

Também os peptídeos antimicrobianos são antigas ferramentas evolutivas do sistema imune contra patógenos, amplamente encontrados na natureza em bactérias, protozoários, plantas e animais (Zelezetsky, et al., 2005). Desde o seu descobrimento em invertebrados, mais de 170 moléculas com propriedades antimicrobianas foram isoladas de artrópodes, anfíbios, plantas e mamíferos (Bulet, et al., 1999). Todas elas compartilham características gerais, como peso molecular em torno de 5-10kDa, carga positiva em pH fisiológico, e a maioria é de moléculas anfipáticas (possuem um grupo hidrofóbico e um grupo hidrofílico), apresentando fitas  $\beta$ , ponte dissulfeto,  $\alpha$ -hélices ou misturas dessas estruturas (Bulet, et al., 1999). A maioria dos peptídeos possui a capacidade de degradar inespecificamente a membrana de uma variedade de microrganismos, levando-os então à morte. Dentre estas moléculas antimicrobianas, podemos citar como exemplo as defensinas (Mark, et al., 1996; Takemura, et al., 1996; Yamashi e Gallo, 2008).

Dentre as células envolvidas na imunidade inata podem ser destacadas as células NK, células dendríticas e os fagócitos, sendo estes últimos extremamente importantes nas respostas contra a maioria dos patógenos. As principais células fagocíticas são os monócitos/macrófagos e os neutrófilos (Janeway e Medzhitov, 2002). Estas células têm como funções primárias a identificação, ingestão (fagocitose) e eliminação de microrganismos e restos celulares, além de imunocomplexos circulantes. Os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN) são muito abundantes e seus precursores estão em constante processo de desenvolvimento na medula óssea. Seu tempo de diferenciação leva em média dois meses, atingindo plena diferenciação terminal antes de sua liberação para a periferia. Os neutrófilos são ricos em grânulos com enzimas (colagenase, elastase e

lisozimas) e uma vez liberados têm um período de vida muito curto, logo entrando em apoptose (4-8 horas, em média) caso não iniciem uma resposta em sítio inflamatório (Gombart e Koeffler, 2002). Os macrófagos (MØ) são células teciduais, sendo os monócitos sanguíneos seus precursores. Os macrófagos são extremamente importantes não só na resposta efetora para eliminação direta dos microrganismos, mas também na regulação da resposta inflamatória por meio da produção de citocinas e ativação de vários tipos celulares. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos não são completamente diferenciados, podendo sofrer divisões, além de evoluírem para outros níveis de diferenciação no decorrer do processo inflamatório (Albiger, et al., 2007).

Caracterizar mais profundamente estas células é essencial para entender seu funcionamento, contribuição e relevância para a defesa do organismo.

## 1.2 FAGÓCITOS

Os fagócitos polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (monócitos/macrófagos) são oriundos da linhagem mielomonocítica. A partir de progenitores celulares precoces (*stem cells*) que recebem uma série de estímulos na medula óssea, como fatores de crescimento (CSF, IL-3), há a formação do progenitor mielóide. Esse segundo progenitor recebe outros estímulos (GM-CSF, IL-3, IL-6) que levam à formação do progenitor de granulócitos, via estimulação por GM-CSF, G-CSF e IL-8, e monócitos, pela estimulação por GM-CSF e M-CSF (Lee, 1992; Naito, 2008).

Os monócitos (MN) estão presentes no sangue, constituindo 3 a 8% dos leucócitos circulantes. Os macrófagos não circulam no sangue, são células que aparecem no tecido conjuntivo ou no parênquima de algum órgão, e originam-se de monócitos, que migraram até o local. Os monócitos têm núcleo ovóide, ou em forma de rim e o citoplasma basófilo, com grânulos azurófilos. É diferente do macrófago, que é uma célula grande, amebóide com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos (Morrissette, et al., 1999).

Os macrófagos (MØ) são células de altíssimo poder fagocítico. Aumentam significativamente seu grau de ativação quando estimulados por interferon gama (IFN- $\gamma$ ), geralmente produzido por linfócitos T helper. Essa citocina estimula a fusão dos lisossomos com o fagossomo para que haja uma digestão intracelular mais eficiente dos patógenos ingeridos. Estes fagócitos possuem diversas enzimas hidrolíticas em seus lisossomos que contribuem para a degradação do patógeno. Além dessas enzimas há liberação de reativos intermediários do oxigênio, como o superóxido, radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estes oxidam as membranas celulares dos patógenos levando a formação de pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais da bactéria, o que leva à morte das mesmas (Appelberg, 2006).

Podem ser ressaltadas duas funções importantes para estas células. A primeira seria a de *clearance* – os macrófagos são células que fazem a “limpeza” de tecidos necrosados, ou que passam por processo inflamatório. Eles fagocitam restos celulares, células mortas, proteínas estranhas ao organismo, calo ósseo que se formou numa fratura, tecido de cicatrização exuberante, etc. Após esta “limpeza”, geralmente os fibroblastos ativos (no caso de uma necrose) vão ao local e preenchem o espaço com fibras colágenas. A segunda função seria a de imunomodulador, como produtor de citocinas. O macrófago é o principal produtor da interleucina 1 (IL-1). Ele produz a IL-1 quando fagocita organismos estranhos (micróbios), dando sinal a outras células do sistema imune, desencadeando uma resposta mais completa e/ou complexa. Esta citocina estimula a ida de linfócitos T CD4+ até o local da infecção, onde há interações com os próprios macrófagos para uma melhor resposta. Além disso, a IL-1 estimula a expansão clonal dos linfócitos T helper e dos linfócitos B específicos contra aquele patógeno. Além da IL-1, há a produção de IL-12, que induz a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos, citocina essa que irá ativar os macrófagos (Kern, et al., 1995; Bogdan, 2006).

Ainda há um outro papel para os macrófagos, o de “apresentador” de antígenos. Os macrófagos são células que fagocitam o antígeno e o degradam no fagolisossomo. Ao mesmo tempo são sintetizadas moléculas do MHC de classe II, que se combinarão com o epítipo para apresentação deste ao linfócito T, que reconhece este complexo “epítipo/molécula de MHC” pelo seu complexo

TCR/CD3/CD4. Esta ligação estimulará vias de sinalização importantes para a produção de citocinas, expressão de moléculas e vários outros sinais que modularão o sistema imune, inclusive de outros fagócitos, como os neutrófilos (Unanue, 1986; Mellman, et al., 1998).

Os neutrófilos correspondem a aproximadamente metade dos leucócitos circulantes em muitas espécies animais. Diferem de outros polimorfonucleares por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos distintos. Estes incluem grânulos primários ou azurófilos, secundários ou específicos e terciários, os quais contêm enzimas, proteínas e glicosaminoglicanos que se acredita, participam de muitas funções destas células (Hellewell e Williams, 1994).

Juntamente com os macrófagos exercem um papel importante na defesa do organismo contra patógenos, sendo a migração desta célula para dentro dos tecidos crucial para a sobrevivência dos mesmos (Lehrer, et al., 1988). Crianças com anormalidades na migração de neutrófilos apresentam infecções recorrentes graves (Beatty, et al., 1984; Geha, et al., 2007) e animais “depletados” experimentalmente de neutrófilos circulantes mostraram-se incapazes de combater bactérias (Weiss, et al., 1982).

Os neutrófilos são atraídos quimiotaticamente por microorganismos e por corpos estranhos presentes nas áreas de inflamação. Em seguida, ocorre a fagocitose e em consequência desta, os microrganismos englobados são mortos por proteínas citotóxicas oriundas de grânulos citoplasmáticos e/ou por espécies reativas de oxigênio (Stites e Terr, 1991). Sabe-se que estas células também são envolvidas na síntese e liberação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), apresentando, portanto, uma função imunomoduladora, além da função de fagocitose e *killing*.

Diferentes trabalhos indicam que estas espécies reativas derivadas do oxigênio têm participação nos processos de inflamação, morte celular e tecidual, transformação neoplásica, aterosclerose e envelhecimento (Hammond, et al., 1985). Por sua rapidez e eficiência na produção de reativos de oxigênio, a mensuração dos níveis de liberação destes é considerada um parâmetro importante na avaliação da ativação de fagócitos (Witko-Sarsat, et al., 2000).

Com relação ao papel imunomodulador dos neutrófilos, é possível relacionar esta atividade com a produção de IL-1, transcritas por estas células dentro de 2 a 6 horas após a estimulação com LPS, IL-1 $\alpha$  ou GM-CSF (Lord, et al., 1991). A IL-1 produzida por neutrófilos pode servir para inúmeras funções, como estimulação de síntese e liberação de proteínas da fase aguda, aumento da ativação de macrófagos e a indução de outras citocinas, como IL-6, IL-8 e GM-CSF (Dinarello, 1991). Juntamente com outra citocina produzida pelos neutrófilos, o TNF- $\alpha$ , a IL-1 pode induzir a formação do edema inflamatório, devido ao aumento da permeabilidade vascular, febre, pela indução da liberação de prostaglandinas e leucotrienos, e demais processos envolvidos com a inflamação tecidual (Abe, et al., 1990).

Os mecanismos que essas células possuem para realizar a eliminação de microrganismos nocivos serão mais detalhados no tópico seguinte.

### **1.3 MECANISMOS DE ELIMINAÇÃO DE PATÓGENOS**

O primeiro passo para a eliminação de patógenos pelos fagócitos é exatamente a internalização destes microrganismos. Este processo de englobamento é denominado fagocitose. Esse processo é restrito a certas células como células dendríticas, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos, sendo usualmente mediado por receptores na superfície das células. Por exemplo, moléculas opsonizantes, como a IgG, aumentam a fagocitose e modulam a resposta inflamatória através da interação com os receptores de superfície que reconhecem a porção Fc do anticorpo ligado ao patógeno (Fc $\gamma$ Rs) (Ravetch, 2001).

Após a fagocitose, os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos possuem diversos mecanismos para eliminar os microrganismos. Os principais mecanismos envolvidos são a produção e secreção de enzimas lisossomais, a acidificação do pH (3-5,4) dos fagossomos, a produção de reativos de nitrogênio (óxido nítrico – não comprovado na espécie humana), a síntese de peptídeos microbicidas (defensinas e proteínas catiônicas), produção de competidores (lactoferrina) e a síntese de produtos tóxicos derivados do oxigênio (Djaldetti, et al., 2002).



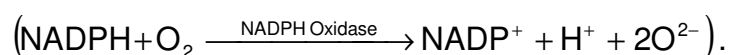
A acidificação do pH do fagossomo se dá por uma série de fatores que envolvem a mudança de polaridade e do potencial elétrico da membrana desta estrutura e a migração de íons para dentro e fora desse compartimento. A presença de enzimas geradoras de radicais livres, como a NADPH oxidase, contribui bastante para essa mudança de potencial e para a migração de íons pela membrana do fagossomo (Rada, et al., 2004). Estudos mostram que após a diminuição ou reversão no potencial da membrana, há alteração no padrão de movimentação de todas as outras moléculas carregadas, favorecendo a movimentação de cátions e ânions. O influxo de íons  $H^+$  e mais recentemente de íons  $K^+$ , foi demonstrado em PMN ativados (Kapus, et al., 1993). Essa movimentação é muito importante para a acidificação do fagossomo. Esse pH ácido é uma importante “ferramenta” para a eliminação de patógenos, pois uma parcela destes microrganismos não resiste a essas condições físico-químicas (Ahluwalia, et al., 2004). Ainda, algumas enzimas lisossomais têm seu funcionamento ótimo em pH ácido, sendo então essa mudança necessária também como fator indireto na atividade microbicida (Reeves, et al., 2002).

Assim como a acidificação do pH, as enzimas lisossomais ou de outros grânulos dos fagócitos constituem mecanismos não oxidativos importantes envolvidos com a degradação de patógenos. Por exemplo, os neutrófilos humanos contêm um grande número de grânulos citoplasmáticos nos quais vários peptídeos microbicidas foram identificados, como defensinas, lisozima, catepsina G, elastase, proteinase 3, azurocidina e lactoferrina (Lehrer e Ganz, 1990). É sabido que após a fagocitose dos microrganismos, esses polipeptídeos microbicidas são transferidos dos grânulos onde estão estocados para o fagolisossomo. O potencial microbicida desses peptídeos já foi evidenciado em relação à *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium fortuitum*, e *Cryptococcus neoformans*, ou seja, possuem um espectro amplo e atividade eficiente (Hiemstra, et al., 1993).

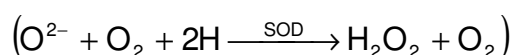
O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (Morris e Billiar, 1994), sendo um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, havendo um elétron desemparelhado (Beckman e Koppenol, 1996). As observações de que

animais portadores de uma deficiência na produção e liberação de  $\text{NO}_3^-$  por macrófagos reforçaram a relação entre o sistema imune e  $\text{NO}_3^-$  (Snyder e Bredt, 1992). Estes dados aliados à demonstração da produção de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  por macrófagos de rato *in vitro*, em resposta ao lipolissacarídeo de *Escherichia coli*, estabeleceram de forma definitiva, uma associação entre a presença de macrófagos, a resposta imune e a síntese de  $\text{NO}_3^-$ . Estudos subseqüentes desenvolvidos por Hibbs e colaboradores (1987) esclareceram a origem do  $\text{NO}_3^-$ , estabelecendo a L-arginina como o aminoácido essencial para a sua produção. Esses pesquisadores estudaram os mecanismos envolvidos nas reações citotóxicas mediadas por macrófagos e verificaram que as atividades tumoricida e bactericida dos macrófagos eram dependentes de L-arginina e inibidas por um análogo desta, a NGmonometil-L-arginina (L-NMMA). Desta forma, demonstraram que o  $\text{NO}_3^-$  e o  $\text{NO}_2^-$  não eram os responsáveis pela citotoxicidade dos macrófagos e sugeriram a existência de um precursor destes compostos na cultura. Palmer e colaboradores (1980) demonstraram que a L-arginina era o precursor fisiológico do NO nas células endoteliais. Com base nesta informação, vários grupos de investigadores suspeitaram que o NO era o provável precursor da síntese de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  em macrófagos. Em seguida, esta hipótese foi comprovada e ficou demonstrado que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imune (Hibbs, et al., 1988). No entanto, faz-se necessário ressaltar que os monócitos/macrófagos humanos em várias condições experimentais não se mostram aptos a produzir NO para eliminação de patógenos (Skorokhod, et al., 2007), sendo os reativos de oxigênio os principais responsáveis pela atividade microbicida na nossa espécie (Condino-Neto, et al., 1993; Condino-Neto, 1994; Condino-Neto, et al., 1996).

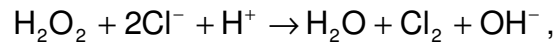
No mecanismo dependente de oxigênio, há uma série de reações enzimáticas desencadeadas em série, iniciadas pela ativação da NADPH oxidase, formando o ânion superóxido a partir do oxigênio



Em seguida ocorre a geração do peróxido de hidrogênio, reação catalisada pela superóxido dismutase



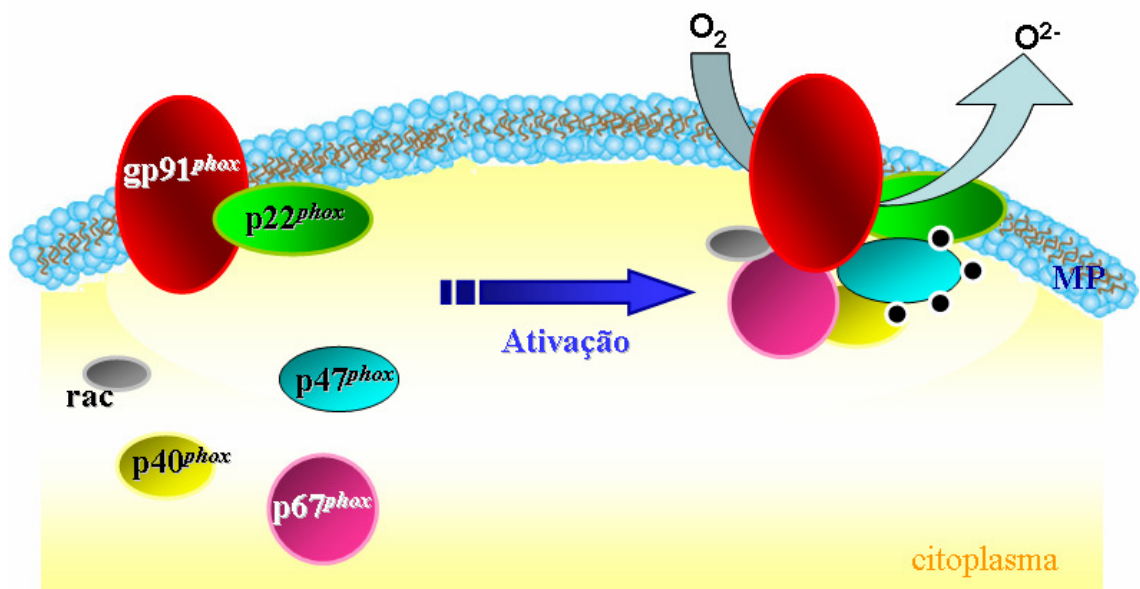
ou pela dismutação não enzimática. O sistema microbicida do peróxido de hidrogênio/mieloperoxidase halogenado ocorre através da seguinte reação:



sendo estes produtos extremamente tóxicos para os patógenos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

#### 1.4 SISTEMA NADPH OXIDASE

Como citado anteriormente, entre os mecanismos microbicidas, os reativos derivados do oxigênio constituem um dos mais importantes. Esses reativos são produzidos a partir de um sistema, chamado NADPH oxidase. Este sistema é constituído por seis componentes principais: p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox*, que são encontrados no citosol dos fagócitos; rac1 (nos monócitos) ou rac2 (nos neutrófilos), proteínas também citosólicas e do tipo ras; p22-*phox* e gp91-*phox* que compõem o citocromo b<sub>558</sub> na membrana (El-Benna, et al., 2005).



**FIGURA 1:** Componentes do Sistema NADPH oxidase. Montagem do complexo na membrana do fagócito, após ativação por estímulo, como PMA.

A ativação dos fagócitos leva à associação dos componentes deste complexo enzimático (Figura 1). Ao se ligarem aos microrganismos via receptores TLR, receptor de manose, receptores de complemento, há a transdução de sinais, levando à fosforilação dos componentes citosólicos p40phox, p47phox e p67phox. O p47phox é então fosforilado, fazendo com que ele próprio e os demais componentes

migrem para a membrana e se associam ao citocromo  $b_{558}$ . Ao mesmo tempo há a proteína Rac-GDP passa a incorporar um ATP, tornando-se Rac-GTP. Essa alteração faz com que a Rac migre para o citocromo  $b_{558}$ . O citocromo é então acionado pela p67phox e pela Rac, iniciando o funcionamento do sistema (Dang, et al., 2001). Uma vez ativado, o sistema NADPH oxidase inicia a explosão respiratória, produzindo reativos do oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que é convertido em ácido hipocloroso (HOCl) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), pela enzima mieloperoxidase (MPO) (Burg e Pillinger, 2001).

A NADPH oxidase pode ser ativada tanto por mediação de receptores quanto por mecanismos independentes destes (Bokoch, 1995). A ativação da NADPH oxidase nos fagócitos pode ser induzida por bactérias e zymosan opsonizados ou não, látex, fragmento C5a do complemento, formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), leucotrieno B4 (LTB4), fator ativador de plaquetas (PAF), Diacilglicerol (DAG) e ativadores de proteína quinase C (PKC), como o miristato de forbol acetato (PMA). O LPS de bactérias gram-negativas induz a produção dos reativos de oxigênio em monócitos (Thiele, et al., 2004) e também induz o *priming* da NADPH oxidase em neutrófilos (DeLeo, et al., 1998) ligando-se ao TLR4. Outros agentes, como a angiotensina II, hormônio principal do sistema renina-angiotensina, estimula a produção de superóxido em neutrófilos (El Bekay, et al., 2003).

Dois eventos acompanham a ativação do sistema NADPH oxidase: fosforilação de proteínas e a translocação de componentes citosólicos para a membrana plasmática. Em condições fisiológicas o *burst* oxidativo é desencadeado pela ligação de um estímulo a seu receptor específico, como o receptor de fMLP ou C5a. O receptor transmite a informação através da membrana citoplasmática via uma família de proteínas G heterotrímicas (proteínas ligantes de GTP). As proteínas G ativam enzimas de membrana como a fosfolipase C (PLC), fosfolipase A2 (PLA2), e fosfolipase D (PLD), conduzindo à liberação de mensageiros intracelulares (Bokoch, 1995). A ativação dos neutrófilos é acompanhada pela ativação de uma série de proteínas kinases, como as tirosinas kinases, PKA, PKC, e MAP-kinases, que fosforilam muitas proteínas com importantes funções celulares, como os componentes da NADPH oxidase.

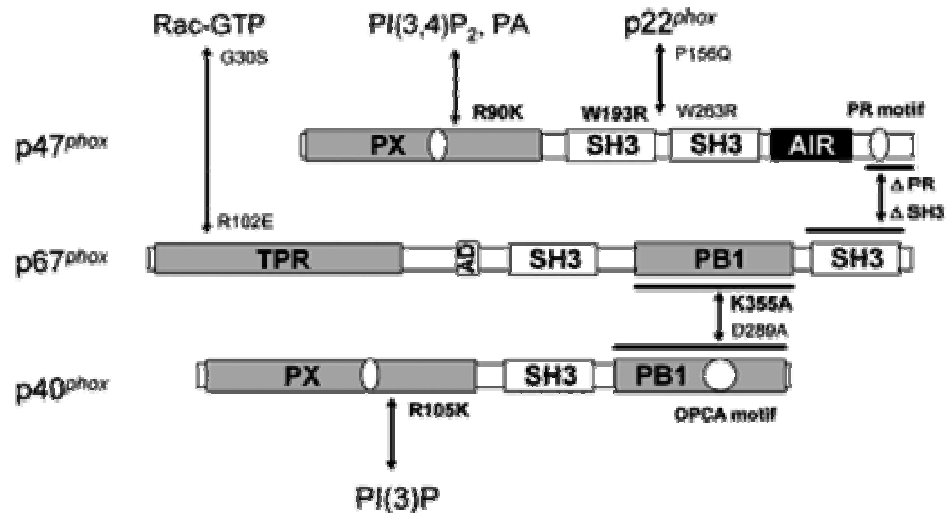
Como já citado acima, o sistema gerador do ânion superóxido possui componentes citosólicos e componentes ligados à membrana. O componente de membrana é composto por uma proteína glicosilada de 91-kDa (gp91phox) e uma proteína não glicosilada de 22-kDa (p22phox), formando um complexo numa proporção de 1:1. Este é conhecido como citocromo  $b_{558}$  pela sua absorvância espectral de 558nm. O citocromo  $b_{558}$  contém um componente FAD e dois hemes, e é a cadeia de transferência de elétrons da NADPH oxidase. Mostra-se como componente central para o acoplamento dos componentes citosólicos e, em particular, o p47phox. O citocromo  $b_{558}$  associa-se com a pequena proteína G Rap1A, que medeia a ligação do p47phox ao citocromo, facilitando a montagem do complexo na membrana (Gabig, et al., 1995). Os componentes citosólicos (Figura 2) da NADPH oxidase de fagócitos são p47phox, p67phox, p40phox, e uma pequena proteína G (rac1 ou rac2). Estando as células em repouso, p47phox, p67phox, p40phox interagem de modo a formar um complexo (Park, et al., 1994). Durante a ativação, cerca de 10% dessas proteínas migram para a membrana (El Benna, et al., 1994).

A p47phox é uma proteína composta de 390 aminoácidos. Sua seqüência COOH-terminal é muito básica e rica em serinas e argininas. A seqüência de aminoácidos da p47phox contém dois domínios SH3, um domínio PX e pelo menos uma região rica em prolina. A p47phox liga-se ao citocromo  $b_{558}$  durante a ativação (de Mendez, et al., 1997). É a subunidade responsável pelo transporte do complexo citosólico (p47phox/p67phox/p40phox) para a membrana durante a ativação da oxidase (El Benna, et al., 1994) e é o responsável por organizar as subunidades da NADPH oxidase. Este processo não pode ocorrer in vivo sem intensa fosforilação da p47phox (Faust, et al., 1995).

A seqüência predita de 526 aminoácidos da p67phox também contém dois domínios SH3, quatro regiões ricas em tetra-trico-peptídeos e pelo menos uma região rica em prolina (Babior, 1999). A p67phox associa-se estreitamente com o citoesqueleto (Woodman, et al., 1991) sendo fosforilada durante a estimulação dos neutrófilos (El Benna, et al., 1997), mas em menor grau do que p47phox. O p67phox interage com rac1/2 e com citocromo  $b_{558}$  (Dang, et al., 2001) e pode regular a sua

atividade catalítica através de uma seqüência chamada de domínio de ativação (Nisimoto, et al., 1999).

A p40phox é uma proteína de 339 aminoácidos que foi inicialmente identificada através da sua ligação à p67phox (Tsunawaki, et al., 1994). Ela contém um domínio SH3 e um domínio PX. É um componente fracamente fosforilado durante a ativação (Sheppard, et al., 2005). Este componente não é exigido para a ativação da NADPH oxidase num sistema *cell-free* e o seu papel *in vivo* ainda é controverso: tanto efeitos inibitórios quanto estimulatórios já foram observados (Kuribayashi, et al., 2002).

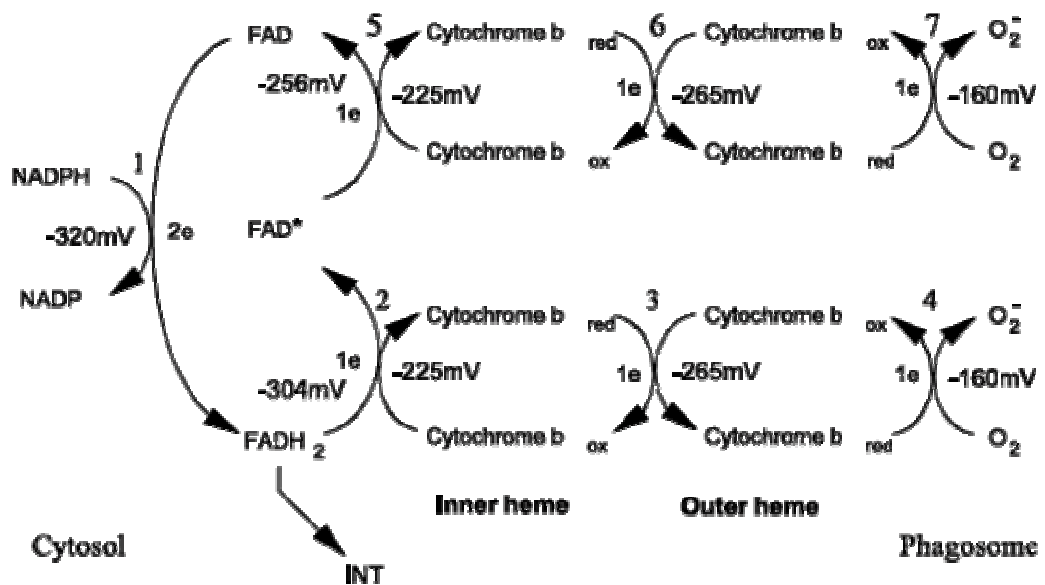


**FIGURA 2:** Domínios das proteínas da oxidase de fagócitos. Representação esquemática dos domínios estruturais e suas interações entre p47phox, p67phox e p40phox. Interações adicionais entre Rac e p67phox, p22phox e p47phox, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PA e o domínio PX da p47phox, e PI(3)P e o domínio PX do p40phox também são mostradas. AIR: região autoinibitória; TPR: tetra-trico-peptídeo repetido; AD: domínio de ativação; PB1: Phox e Bem1. Mutações que quebram essas interações são mostradas próximas às setas.

FONTE: adaptado de Ueyama et al., 2007.

Em neutrófilos humanos, a p21-rac2 é a proteína rac mais abundante, mas p21-rac1 (92% homólogo com Rac2) também é observada (Quinn, et al., 1993). Como o citocromo *b*<sub>558</sub>, p47phox e p67phox, a Rac é indispensável para otimizar a ativação da NADPH oxidase num sistema *cell-free* e nos neutrófilos intactos (Williams, et al., 2000).

Após o acoplamento de todas as subunidades da NADPH oxidase há sete passos distintos para a transferência de elétrons durante um único ciclo de ativação do sistema. De uma maneira geral, essa seqüência de trocas de elétrons para a geração do superóxido pode ser observada na figura abaixo (Figura 3). Há uma transferência inicial de dois elétrons da NADPH para o FAD oxidado. Nesse caso o FAD é responsável por transferir apenas um elétron, dos dois obtidos, para as etapas seguintes. A segunda etapa é de transferência eletrônica do FAD reduzido para o domínio heme interior, gerando um FAD denominado semiquinone, sem elétrons livres ( $\text{FAD}\cdot$ ). Na terceira e quarta etapas, o elétron é transferido a partir do domínio heme interior para o exterior e daí para o oxigênio formar o superóxido (Crossa e Segal, 2004). Essa perfeita seqüência de transferência de elétrons é essencial para a geração de uma resposta microbicida adequada e uma efetiva eliminação de patógeno.



**FIGURA 3:** Vias de transferência de elétrons dentro do flavocitocromo  $b_{558}$ . Os sete passos de transferência estão numerados. A transferência de elétrons ocorre do NADPH citosólico através da membrana para o fagossomo.

FONTE: adaptado de Ueyama, et al., 2007.

### 1.5 DEFICIÊNCIA DE FAGÓCITOS

De uma forma geral, a resposta eficiente contra os diversos microrganismos requer o funcionamento total da maquinaria dos fagócitos, incluindo proteases,

peptídeos microbicidas e reativos de oxigênio (Janeway, 1989). Uma vez que o sistema imune inato possui vias essenciais na regulação de todos os aspectos da imunidade, disfunções dos seus componentes podem contribuir para o desenvolvimento de patologias. Dois tipos gerais de alterações genéticas que podem levar às anormalidades imunológicas são mutações que inativam receptores ou moléculas de sinalização relacionadas no reconhecimento pela imunidade inata e mutações que levam às falhas constitutivas na ativação das células da imunidade inata ou nos seus mecanismos de resposta (Epstein, et al., 1996; Fraser, et al., 1998).

Defeitos primários em fagócitos devem ser suspeitos frente a um diagnóstico de infecções recorrentes, principalmente nas áreas de barreira como pele, trato respiratório e linfonodos, além de febre persistente. Geralmente essas manifestações ocorrem precocemente na infância (Rosenzweig e Holland, 2004).

Também sugestiva é a falha da resolução de infecção por tratamentos convencionais (Malech e Nauseef, 1997). O diagnóstico precoce é essencial, pois as manifestações infecciosas são usualmente graves e a rápida intervenção é importante para salvar a vida do paciente. Em alguns casos, a doença pode ser identificada por características dos agentes infecciosos como: microrganismos catalase-positivos e *Aspergillus*, no caso da doença granulomatosa crônica (Heyworth, et al., 2003), e micobactéria atípica, infecção clássica em pessoas com defeito no eixo IL-12/IFN- $\gamma$  (Dorman e Holland, 2000; Mansouri, et al., 2005).

Geralmente os defeitos nos fagócitos resultam de uma mutação que afeta o sistema imune inato. Por exemplo, deficiência de adesão de leucócitos tipo 1 resulta da perda de proteínas de adesão de neutrófilos, que causam leucocitoses a partir do momento que os neutrófilos perdem a habilidade de migrar para os sítios de infecção, persistindo na circulação (Anderson, et al., 1985). No caso dos pacientes com Doença Granulomatosa Crônica, a falha genética pode ser encontrada em qualquer um dos componentes do sistema NADPH oxidase, resultando falha de produção do ânion superóxido e, conseqüentemente, dos seus derivados (Jurkowska, et al., 2004).



Na forma ligada ao sexo da DGC, é afetada a cadeia pesada do citocromo  $b_{558}$ , no caso, o componente gp91phox (60% dos casos) podendo ocorrer ausência, mau funcionamento ou baixa expressão desta glicoproteína (Rae, et al., 1998). Nas formas autossômicas recessivas é afetado um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, respectivamente a p47phox ou p67phox (respectivamente 30% e 6% dos casos) (Görlach, et al., 1997; Kenney, et al., 1993); ou ainda a cadeia leve do citocromo  $b_{558}$ , o componente p22phox (6% dos casos) (Rae, et al., 2000). O fenótipo com ausência de gp91phox é o mais freqüente, e caracteriza-se por atividade NADPH oxidase nula. O fenótipo com baixa expressão de gp91phox é menos freqüente, e se refere à forma variante da DGC, laboratorialmente caracterizada por neutrófilos com baixa atividade NADPH oxidase, proporcional ao nível de citocromo  $b_{558}$  expresso (Newburger, et al., 1986; Roos, et al., 1996; Rae, et al., 1998). No fenótipo onde a expressão de gp91-phox (“defeituoso”) é normal, o citocromo  $b_{558}$  encontra-se em níveis normais, entretanto sua atividade está diminuída ou ausente. A maioria das formas autossômicas recessivas de DGC não guarda expressão residual do componente afetado.

## 1.6 TRATAMENTOS

Uma das formas de tratamento para os pacientes com DGC é a aplicação de IFN- $\gamma$ , verificando-se uma melhora significativa no quadro de alguns pacientes tratados (Marciano, et al., 2004). No início, esse tratamento baseava-se no fato dos pacientes com DGC produzirem NO constitutivo de maneira normal, mostrando que essa produção não seria dependente do sistema NADPH oxidase funcional (Condino-Neto, 1996; Adler, et al., 2003). Uma vez que o IFN- $\gamma$  induz a síntese de NO e aumenta a expressão de RNAm para a NO sintase induzível em modelos murinos, esse poderia ser o mecanismo de ação para melhora no quadro dos pacientes com DGC (Ahlin, et al., 1999). Entretanto, experimentos envolvendo terapia com IFN- $\gamma$  em pacientes com DGC demonstram que não ocorreu a indução da síntese de grandes quantidades de NO em seus leucócitos e tampouco mudou suas características quanto às funções imunológicas usuais (Condino-Neto, et al., 1996).

Contudo vários trabalhos mostram que o IFN- $\gamma$  produzido principalmente por linfócitos T CD4+, T CD8+ ativados e células NK, é um ativador de macrófago *in vivo* e *in vitro*, por estimular o sistema NADPH oxidase aumentando sua capacidade microbicida (Newburger e Ezekowitz, 1988; Murray, 1993; Murray, et al., 1995). O IFN- $\gamma$  é um potente ativador de macrófagos, aumenta expressão de moléculas de MHC classe II, promove a diferenciação de linfócitos T CD4+ naive em linfócitos da linhagem Th1 e inibe a proliferação de Th2, atua sobre linfócitos B estimulando a síntese de IgG2a e IgG3, e inibe a síntese de IgG1 e IgE; ativa também neutrófilos aumentando sua explosão respiratória, entre outras funções (McKnight, et al., 1994).

Com este efeito, o IFN- $\gamma$  é usado como controle positivo em vários modelos de ativação de fagócitos, garantindo um aumento na diferenciação e ativação destas células. Uma das razões pela qual ele promove uma alta ativação de fagócitos é a de que seus receptores são expressos principalmente nessas células. São compostos por duas cadeias alfa, e duas cadeias beta. A via de sinalização ativada após a interação do IFN- $\gamma$  aos receptores é a via Jak/STAT, envolvendo os componentes Jak1, Jak2 e STAT1 (Moriwaki, et al., 2006). Defeitos nos receptores de IFN- $\gamma$  resultam numa das formas de susceptibilidade mendeliana a micobacterioses (Rottman, et al., 2008) e na falha do burst oxidativo e expressão do gene CYBB que codifica a proteína gp91phox (Prando, 2008).

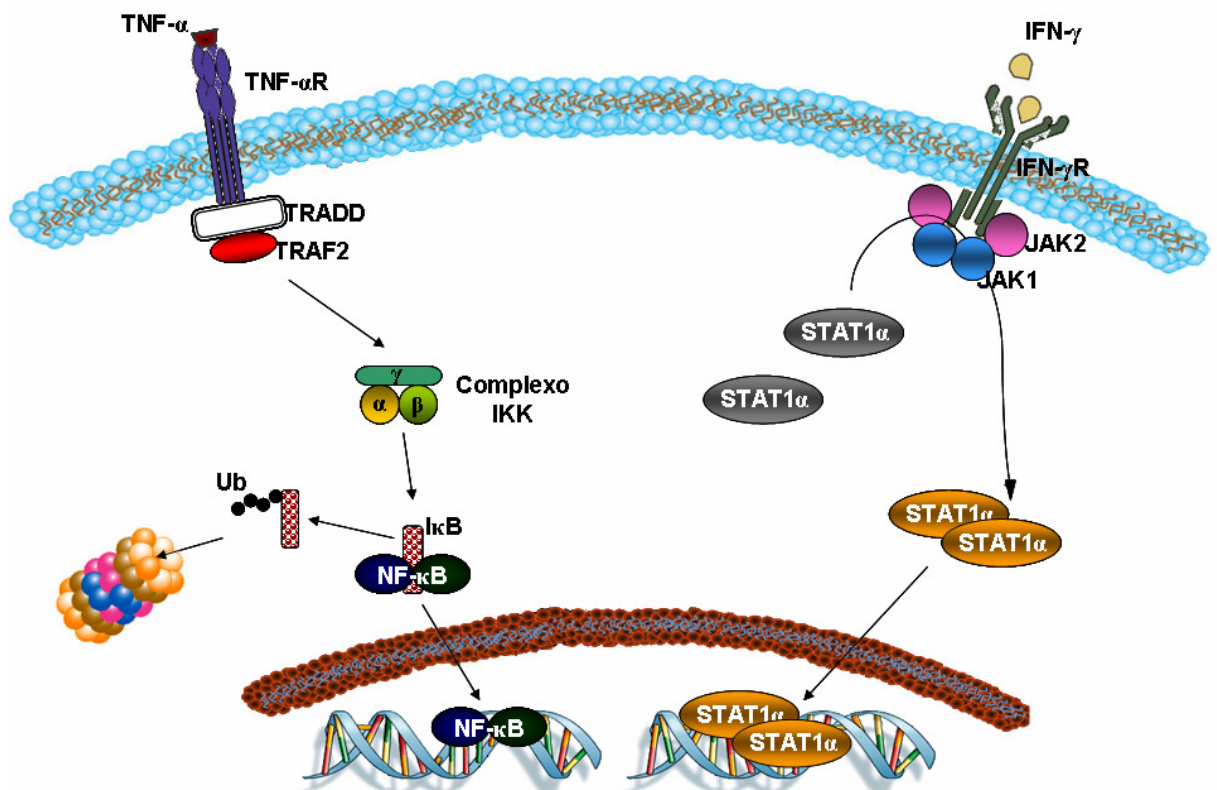
O TNF- $\alpha$  tem como principal fonte o macrófago ativado, apresenta funções imunomoduladoras (Schulze-Osthoff, et al., 1992) e pró-inflamatórias (Azzawi e Hasleton, 1999; Azzawi, et al., 1999), sendo que uma delas é ativar a produção de espécies reativas do oxigênio, exercendo um efeito sinérgico quando associado ao IFN- $\gamma$  (Cassatella, et al., 1985; Newburger, et al., 1991; Condino-Neto, et al., 1998). O TNF- $\alpha$  também exerce seu efeito por meio da ligação e agrupamento a receptores específicos de alta afinidade que estão presentes na membrana plasmática de quase todas as linhagens celulares, ocasionando a síntese de citocinas e a geração de ânion superóxido (Dri, et al., 1999; Werling, et al., 2004).

Experimentos com células mielomonocíticas humanas THP-1 mostraram que a cultura com IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , de maneira isolada ou em associação induz as células mielomonocíticas THP-1 a se diferenciar e expressar atividade NADPH oxidase;

induz também a transcrição dos genes que codificam os componentes gp91phox e p47phox da NADPH oxidase (Condino-Neto, et al., 1998).

### 1.7 VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS

Todas essas reações e respostas de fagócitos quando estimulados por IFN- $\gamma$  e outros componentes ativadores, têm relação com as vias de transdução de sinais. Múltiplas reações podem ocorrer entre o agente oxidante e alvos moleculares (Figura 4). Somente essas modificações que são eficientes para ativar os dois lados serão capazes de gerar uma resposta biológica eficiente. Está bem definido, por exemplo, a interação de NO com a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (Karaghiosoff, et al., 2000; Chakravorty, et al., 2001; Chan, et al., 2001; Kristof, et al., 2001). Na linhagem celular mielomocítica humana U937 são detectados mRNA e proteínas de eNOS. A enzima ativa é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , a calmodulina, e resulta em acúmulo de cGMP (Roman, et al., 1997).



**FIGURA 4:** Vias de transdução de sinal do TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Estas citocinas ativam vias de transdução de sinais importantes nas funções de fagócitos, como as que envolvem os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e STAT. Estes fatores são importantes na expressão de genes inflamatórios.

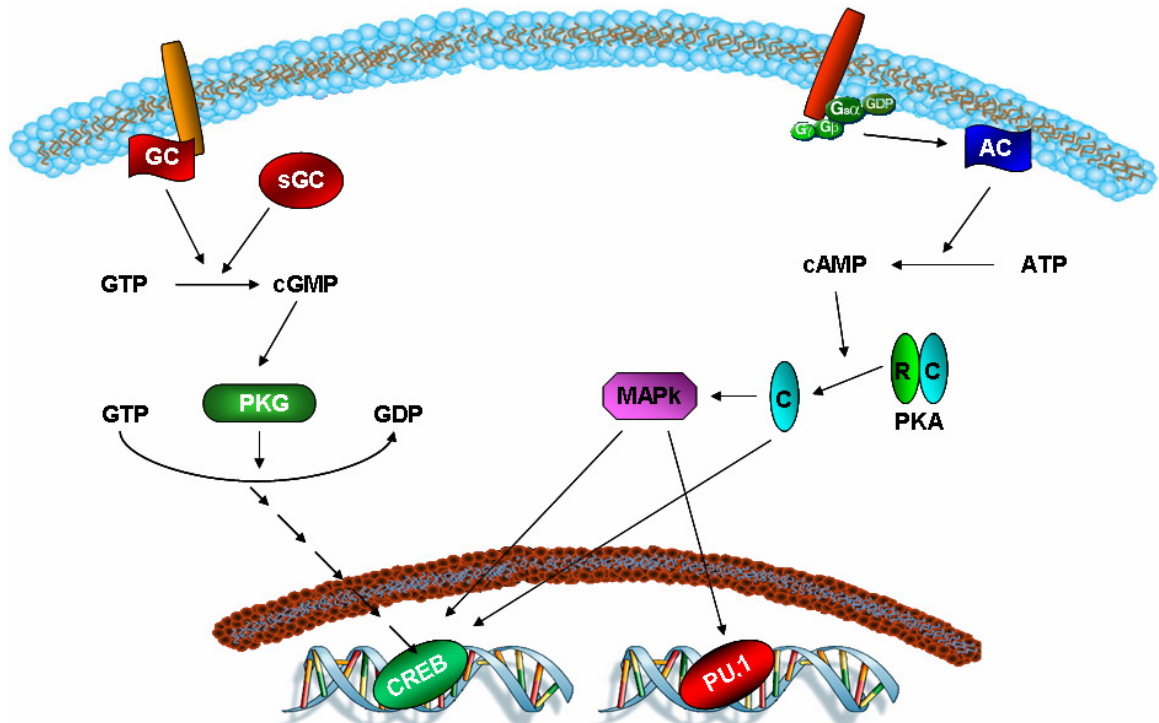
Outro ponto essencial da transdução de sinal são os fatores de transcrição. Estes são essenciais para ativação de sítios específicos em seqüências gênicas, fazendo com que a expressão seja ativada e/ou aumentada. O NF- $\kappa$ B é um importante ativador transcricional de genes envolvidos na inflamação, sendo inativo quando permanece ligado a proteínas plasmáticas I $\kappa$ B. Muitos estímulos induzem a fosforilação e degradação do inibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), e desse modo permitem ativação e translocação do NF- $\kappa$ B ao núcleo celular. O NO pode aumentar ou diminuir a atividade NF- $\kappa$ B dependendo de sua concentração, do tipo celular e de co-estímulos (Kroncke, et al., 1998; Kolb, et al., 1998; Hickey, et al., 1997).

Em cardiomiócitos, doadores de NO aumentam a atividade do NF- $\kappa$ B e induzem a expressão de um gene receptivo ao NF- $\kappa$ B em um modelo cGMP/PKG dependente. Nestas células, o cGMP induz fosforilação e degradação de I $\kappa$ B-alfa, e fosforilação direta de I $\kappa$ B-alfa por PKG *in vitro* (Figura 5) (Spiecker, et al., 1998).

O aumento nos níveis de cGMP induz seletivamente a expressão do receptor beta2 de IL-12 (IL-12R $\beta$ 2) e não do receptor de IL-4 (IL-4R) nas células T, levando a uma proliferação seletiva de linfócitos Th1 (Niedbala, et al., 2002). Alguns relatos mostram que o cGMP aumenta a proliferação de células endoteliais. O efeito pró-proliferativo de cGMP em células endoteliais está relacionado ao aumento da atividade de Erk-1/2, e da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Nussler, et al., 1994; Nagasaki, et al., 1996). E, uma vez que a via de síntese de G-CSF, conhecido estimulador de neutrófilos, passa pela ativação de Erk-1/2 (Dong et al., 2001), pode-se inferir uma relação do cGMP com a ativação destes fagócitos por esta via.

A enzima GCs é um heterodímero composto de subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  (Hobbs, 1997), com massas moleculares de 77 e 70 kDa, respectivamente (Koesling, et al., 1991). Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal. A expressão das duas subunidades é necessária para a atividade catalítica (Harteneck, et al., 1990; Buechler, et al., 1991). A GCs é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e 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).



**FIGURA 5:** Vias de transdução de sinal do cGMP e cAMP. O cGMP e cAMP ativam vias de transdução de sinais variadas, entre elas as que envolvem proteínas kinases (PKG, PKA) e MAP kinases. Essas vias culminam na ativação de fatores de transcrição, como o CREB e PU.1.

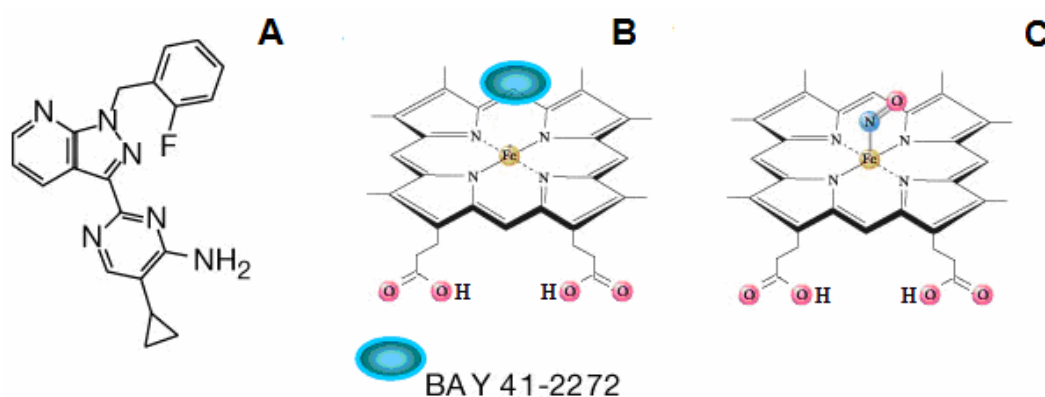
A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da GCs pelo NO (Gerzer, et al., 1982; Ignarro, et al., 1982; Ohlstein, et al., 1982). O grupo heme corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição central, o qual pode encontrar-se como  $\text{Fe}^{2+}$  (forma reduzida) ou  $\text{Fe}^{3+}$  (forma oxidada). O quinto membro do anel na GCs é um ligante axial imidazólico na posição His105 (Stone e Marletta, 1994). A mutação deste aminoácido, localizado próximo ao N-terminal da subunidade  $\alpha 1$ , determina a incapacidade da GCs de se ligar ao grupo heme, resultando em uma enzima insensível ao NO (Wedel, et al., 1994). O NO ativa GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-feronitrosil. A ligação entre a His105 axial e o ferro, resulta num anel onde o NO está presente na quinta posição e cria uma mudança conformacional que ativa a GCs (Traylor e Sharma, 1992). Esta ativação causa uma elevação nos níveis de cGMP, o qual é clivado a partir do trifosfato de guanosina (GTP) pela GCs (Rapoport, et al., 1983), embora

sejam propostos vários mecanismos para um aumento nos níveis de cGMP induzido pelo NO (Waldman e Murad, 1987).

### 1.8 BAY 41-2272

Experimentalmente a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e seu RNAm foram detectados em macrófagos murinos. Foi também estabelecido o efeito de NO derivado de eNOS na expressão de genes reguladores pro-inflamatórios que são até certo ponto dependentes da ativação de GCs e produção de cGMP. A deficiência de eNOS pode ser reproduzida com inibidor do sítio de GCs sensível ao NO, 1H-(1,2,4) oxadiazolo (4,3-a) quinoxalin-1-one (ODQ) e revertida com um novo ativador de GCs não dependente de NO, o BAY 41-2272 (Stasch, et al., 2001).

O fármaco BAY 41-2272 é 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 (Ko, et al., 1994; Wu, et al., 1995). 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) e tem sua atividade intensificada na presença do NO (Brioni, et al., 2002). Koglin e colaboradores (2002) mostraram que o BAY 41-2272 ativa também a isoforma heterodimérica  $\alpha_2/\beta_1$  da sGC. Uma região N-terminal do aminoácido 104 ao 401 da subunidade  $\alpha_2$  representa o sítio de ligação para o BAY 41-2272 (Figura 6).



**FIGURA 6:** Estrutura do BAY 41-2272 (A). Sítios de ligação do BAY 41-2272 (B) e do NO (C) à enzima Guanilato Ciclase solúvel.

Em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMØ) de ratos incubados com inibidor do sítio de GCs, ODQ (Garthwaite, et al., 1995) (10 uM) e 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) (0,1–30µM) e células ativadas com 100 ng/mL de LPS, a expressão de iNOS foi monitorada após 9 e 24 horas, demonstrando que BAY 41-2272 exerce efeito dose dependente na potencialização da expressão de iNOS. O efeito potencial de geração de cGMP foi revertido pelo ODQ (10 uM), confirmando a importância da GCs na regulação da ativação de macrófagos (Connelly, et al., 2003).

BAY 41-2272 e seu análogo BAY 41-8543 são moléculas com características e mecanismos similares ao YC-1. Foram recentemente descritas como ativadores específicos de GCs, porém sendo muito mais potentes e desprovidas de atividade inibitória sobre fosfodiesterases (Stasch, et al., 2001; Stasch, et al., 2002). No entanto, esses dados são contraditórios a experimentos recentes que evidenciam a atividade inibitória da fosfodiesterase tipo 5 pelo BAY 41-2272 (Mullershausen, et al., 2004).

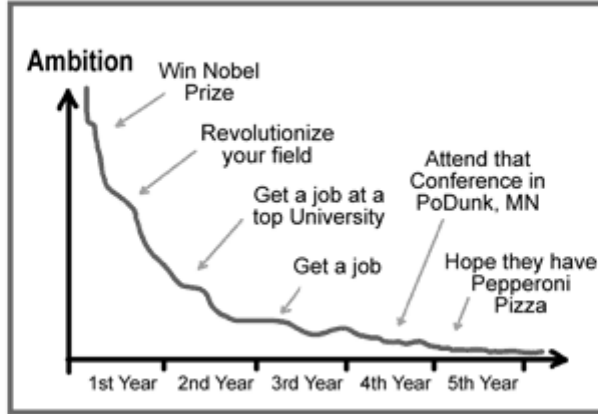
Experimentos demonstraram uma potente ativação da GCs pelo BAY 41-2272 nas concentrações de 0,1 nM a 100 µM. Esta estimulação foi potencializada na presença de doador de NO 2-(*N,N*-dietilamina)-2-óxido diazodato (DEA/NO) (1 uM) (Becker, et al., 2001). Em estudos utilizando-se enzimas desprovidas de grupamento heme, o BAY 41-2272 não foi capaz de ativar a enzima. Portanto, a ativação da GCs pelo BAY 41-2272 é heme-dependente (Stasch, et al., 2001).

Experimentos recentes com células mielomonocíticas humanas THP-1 mostraram que a cultura com BAY-412272 estimula a produção de superóxido, aumenta a expressão da gp91phox e eleva os níveis de cGMP e cAMP (Oliveira-Junior, et al., 2007). Uma vez verificados esses efeitos do BAY 41-2272, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos desse fármaco em fagócitos humanos e acrescentar novos conhecimentos sobre o funcionamento do sistema NADPH oxidase, sua regulação e defeitos genético-moleculares do sistema. Tudo isso tendo em vista o grande potencial ativador desse fármaco sobre as linhagens mielóides humanas. Futuramente poderemos testar seus efeitos clínicos em benefício dos

pacientes com Doença Granulomatosa Crônica, com sua inclusão na categoria de novos possíveis tratamentos.



# YOUR LIFE AMBITION - What Happened??



JORGE CHAM © 2008

WWW.PHDCOMICS.COM

## 2 OBJETIVOS

## **Geral**

Determinar o potencial farmacológico do BAY 41-2272 quanto à ativação de fagócitos da linhagem mielocítica humana, analisando a ativação do sistema NADPH oxidase, além das atividades fagocítica e microbicida destas células.

## **Específicos**

Visando atingir este objetivo, avaliaram-se os efeitos do tratamento com BAY 41-2272 em células THP-1 da linhagem mielocítica, monócitos e neutrófilos, com relação à:

- a) Produção de ânion superóxido;
- b) Produção de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ;
- c) Atividade fagocítica sobre partículas de Zymosan;
- d) Atividade microbicida sobre *E. coli* enteropatogênica (EPEC);
- e) Expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase – gp91phox.

What your research supposedly looks like:

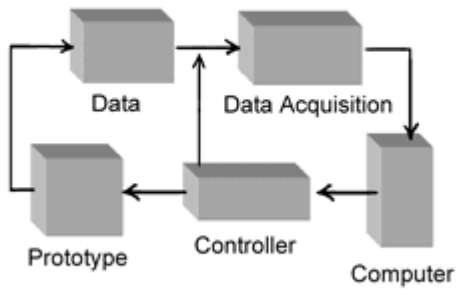


Figure 1. Experimental Diagram

What your research *actually* looks like:



Figure 2. Experimental Mess

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

### **3.1 NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO**

#### **3.1.1 Obtenção das células do sangue periférico**

As células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (PBMC) foram obtidas de um volume de 20 mL de sangue periférico coletados de indivíduos sadios (sem doenças infecto-contagiosas ou congênitas comprovadas). As alíquotas de sangue foram fracionadas em gradiente de densidade, Ficoll-Hepaque (Sigma Histopaque 1077 g/mL e 1119 g/mL, St. Louis, EUA), segundo instruções do fabricante (Fishbeck, 2001). Em seguida as células já separadas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, CA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco-Invitrogen, CA, USA) pelo calor (56 °C/ 1 hora), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco-Invitrogen, CA, USA), a 37 °C, em atmosfera úmida, saturada em 5% de CO<sub>2</sub>, em condições livre de endotoxina (<10 pg/mL). Estas culturas foram mantidas apenas pelo tempo necessário para o tratamento e procedimentos experimentais, não sendo feitas imortalizações ou quaisquer outros tipos de banco de material celular.

#### **3.1.2 Isolamento dos monócitos aderentes das culturas de PBMC**

Para minimizar a interferência dos linfócitos nos ensaios, incubamos os PBMC antes de realizar os tratamentos, a fim de recuperar apenas os monócitos aderentes. Essa incubação foi feita por 6 horas em placas de cultura de 24 poços (COSTAR – Corning Incorporated, NY, EUA), nas condições de temperatura, meio de cultura e saturação de CO<sub>2</sub> descritas acima. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido e transferido para um microtubo. As placas foram então lavadas três vezes com meio de cultura para retirada das células não aderentes. Após as lavagens, os monócitos aderentes foram mantidos em cultura com os tratamentos que serão descritos a frente na metodologia.

#### **3.1.3 Imunofenotipagem dos PMN para molécula de CD16**

Após a obtenção dos PMN procedeu-se a análise por citometria de fluxo para definir a porcentagem de neutrófilos – consideradas como células PMN expressando CD16 (CD16<sup>+</sup>) – estávamos obtendo com a nossa metodologia de separação. A

imunofenotipagem foi realizada logo após a coleta das amostras. Para tanto usamos  $1 \times 10^6$  PMN por marcação (tubo). Os seguintes anticorpos monoclonais usados foram: CD16-FITC (BD Bioscience, San Francisco, CA, EUA); mIgG2a-FITC (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA), seguindo o desenho experimental do quadro abaixo de distribuição nos tubos mostrado abaixo (Tabela 1). As células foram postas nos tubos de FACS e marcadas por 30 minutos com os anticorpos específicos. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS (centrifugação – 3000 rpm/5 minutos/4 °C) e ressuspensas em PBS 1x para leitura no citômetro de fluxo, FACSCalibur™ (BD Bioscinces, CA, EUA). As análises das aquisições foram realizadas no programa FlowJo (Tree Star Inc., OR, EUA) (ANEXO A).

**TABELA 1:** Anticorpos utilizados em cada tubo.

<b>Tubo</b>	<b>Células</b>	<b>Anticorpos</b>
1	$1 \times 10^6$ PMN em 100 $\mu$ L de PBS	---
2	$1 \times 10^6$ PMN em 100 $\mu$ L de PBS	1 $\mu$ L mIgG2a-FITC
3	$1 \times 10^6$ PMN em 100 $\mu$ L de PBS	1 $\mu$ L CD16-FITC

### 3.2 LINHAGEM THP-1

A linhagem de células pró-monocíticas, THP-1, é mantida no nosso laboratório cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, e 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol, a 37 °C, em atmosfera úmida, saturada em 5% de CO<sub>2</sub>, em condições livres de endotoxina (<10 pg/ml). As culturas são mantidas por meio de repiques em períodos inferiores a 30 dias, fazendo-se a troca do meio de cultura a cada 48 horas, ou quando percebe-se a acidificação do mesmo.

### 3.3 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

As doses de BAY 41-2272 (BAYER Healthcare, Leverkusen, Alemanha) para o tratamento *in vitro* das células foram padronizadas por Oliveira-Junior e colaboradores (2007). É importante ressaltar que o BAY 41-2272 possui solubilidade

quase nula em água e muito baixa em álcool, portanto o fármaco foi diluído em dimetil-sulfóxido – DMSO (Synth, SP, Brasil).

Para os tratamentos, além do BAY 41-2272, foram utilizados PMA (Acetato de Forbol Miristato – Sigma, St. Louis, EUA) e IFN- $\gamma$  humano recombinante (R&D Systems Inc., EUA) como estímulos positivos de controle para o tratamento das células, e DMSO nas concentrações correspondentes àquelas que se encontra diluindo o fármaco em análise. A partir destas células, após tratamento, realizamos os experimentos.

Os tratamentos foram feitos segundo os esquemas abaixo:

- para PBMC e THP-1:

Por 1 hora: 1) DMSO (0,5%); 2) IFN- $\gamma$  (100 U/mL); 3) BAY 41-2272 (1  $\mu$ M); 4) BAY 41-2272 (3  $\mu$ M)

Por 48 horas: 1) DMSO (0,5%); 2) IFN- $\gamma$  (100 U/mL); 3) BAY 41-2272 (1  $\mu$ M); 4) BAY 41-2272 (3  $\mu$ M)

- para neutrófilos:

Por 1 hora: 1) DMSO (0,5%); 2) IFN- $\gamma$  (100 U/mL); 3) BAY 41-2272 (1  $\mu$ M); 4) BAY 41-2272 (3  $\mu$ M)

No caso do ensaio de dosagem de ânion superóxido, acrescentou-se um tratamento com PMA, em uma concentração final de 30 nM, para todos os tipos celulares e nos tempos descritos acima.

### **3.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM DMSO E BAY**

As células (THP-1, PBMC e neutrófilos) foram tratadas com DMSO (0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%) ou BAY 41-2272 (0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), por 1h, 12h, 24h, 48h e 72h. Em cada um dos tempos marcados foi contada a viabilidade das células, usando câmara de Neubauer (Glasser, SP, Brasil) e azul de tripan a 1,4%, em microscópio óptico sob aumento de 400X (Labomed Inc., CA, EUA). Os resultados foram expressos pela proporção de células vivas e mortas em relação ao total conferido de 200 células em campos aleatórios. A reatividade do

azul de tripan é baseada no fato de que este cromóforo é negativamente carregado e não interage com as células antes de suas membranas serem danificadas. Portanto, todas as células não coradas foram consideradas viáveis (ANEXO B).

### **3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR PELO ESPRAIAMENTO**

As células (THP-1, PBMC e neutrófilos) foram tratadas com DMSO (0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%) ou BAY 41-2272 (0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), por 1h, 12h, 24h, 48h e 72h. Após os tempos de tratamento foi realizada a análise da aderência e espraio das mesmas.

O ensaio de capacidade de espraio dos fagócitos foi estimado de acordo com método previamente descrito (Rabinovitch e DeStefano, 1973). Amostras de 100  $\mu$ L de suspensão celular ( $\approx 1 \times 10^5$  células) foram colocadas em lâminas de vidro (Precision, SP, Brasil) e depois deixadas aderir por 15 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas com PBS e incubadas com 1mL de meio RPMI 1640, suplementado como descrito acima, por 1h a 37 °C. As células foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% e a porcentagem das células espraídas foi determinada em microscópio de contraste de fase sob aumento de 400X (Labomed Inc., CA, EUA).

A porcentagem de espraio foi definida como a razão entre as células “espraídas” e 200 células contadas. Células aderidas/espraídas foram assim definidas quando mudaram a sua conformação arredondada para uma silhueta irregular, mostrando um corpo refratário sob luz branca e com diâmetros maiores quando comparadas com células não espraídas.

### **3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO**

Para esta avaliação usamos a técnica de dosagem de superóxido liberado por PBMC e PMN do sangue periférico e células THP-1, já estabelecida em nosso laboratório (Condino-Neto, et al., 1996; Condino-neto, et al., 1998). Essa técnica tem por princípio a avaliação colorimétrica da redução do citocromo c pelo superóxido, especificamente inibida pela superóxido dismutase (SOD).

Após os tratamentos farmacológicos, previamente citados, as células (PBMC e neutrófilos) foram ressuspensas numa concentração final  $2 \times 10^6$  células/mL, e incubadas com PMA (30 nM) na presença de citocromo *c* (80  $\mu$ M), contendo ou não SOD (75 UI/mL), durante 1 hora a 37 °C. A reação de liberação espontânea foi avaliada usando-se PBS com glicose (1,5%) ao invés de PMA. A absorbância dos sobrenadantes foi medida em comprimento de onda de 550 nm. A produção de ânion superóxido foi calculada usando-se um coeficiente de extinção de  $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e os resultados foram expressos em nmols de  $\text{O}_2^{\bullet-}/10^6$  células/hora.

### **3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA**

As células (THP-1, PBMC e neutrófilos) foram ajustadas para  $2 \times 10^6$ / mL e incubadas, após os tratamentos descritos acima, por 1 hora à 37 °C com Zymozan (Sigma, St. Louis, EUA) não opsonizado (10 partículas/célula) em placas de cultura de 12 poços (COSTAR – Corning Incorporated, NY, EUA). Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 não suplementado. Foi feita em seguida a montagem das suspensões celulares em lâmina e lamínula de vidro com uma alíquota de 25  $\mu$ L. Estas foram examinadas em microscópio óptico, usando contraste de fase para visualização das partículas que foram englobadas.

Foram consideradas células com atividade fagocítica as que englobaram pelo menos duas partículas de Zymosan. Para determinação da porcentagem de fagocitose, foram contadas 200 células em campos aleatórios e determinada a proporção de células que fagocitaram pelo total contado. Além da contagem das células, foram tiradas fotografias com sistema de câmera digital, Sony w80, 7.2MP, acoplado ao microscópio. As fotografias foram tiradas em aumento de 400x, sem utilização do zoom da câmera. As imagens foram tratadas quanto ao brilho e contraste, ou utilização de filtros automáticos no software Paint.NET versão 3.08 (Microsoft Corporation, CA, USA).



### 3.8 AVALIAÇÃO DA FAGOCITOSE E ATIVIDADE BACTERICIDA

#### 3.8.1 Linhagem de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e padronização da concentração bacteriana

Para avaliar a atividade bactericida *in vitro* dos fagócitos tratados, foi utilizada a cepa de EPEC HMJ 0041-1-85, sorotipo O11:H<sup>-</sup>AI<sup>-</sup>, eae<sup>+</sup>, eaf<sup>+</sup>, bfp<sup>+</sup>, isolada de uma criança com diarreia no Hospital Municipal Infantil Menino Jesus – SP, preparada pela Dra. Maria de Lourdes Monteiro da Silva, e cedida gentilmente pela Dra. Gerlândia Neres Pontes.

Nos ensaios de fagocitose e atividade bactericida, foi utilizada a concentração de  $2 \times 10^7$  bactérias, determinadas pela contagem de unidades formadoras de colônias bacterianas. Foi realizado o cultivo da EPEC O11 em meio de cultura BHI líquido (Gibco-Invitrogen, CA, EUA), incubado a 37 °C durante 18 horas (suspensão bacteriana). A seguir, a suspensão bacteriana foi lavada duas vezes (centrifugação – 1500 rpm/10 minutos/25 °C) em solução salina tamponada (PBS) para bactérias, ajustando a suspensão bacteriana em espectrofotômetro para densidade óptica (D.O.) 0,2 em comprimento de onda de 540 nm. Essa suspensão constitui a solução mãe/estoque mantida em alíquotas de 50 µL congeladas a -80 °C em meio de cultura líquido BHI e glicerol 30% na proporção de 1:1 (v:v) para uso nos ensaios.

Dezoito horas antes da realização dos ensaios, alíquota da EPEC O11, mantida como descrito acima, foi repicada em tubos contendo 8 mL de meio de cultura BHI líquido, e estes incubados por 18 horas a 37 °C. Após este período, as bactérias foram lavadas duas vezes em PBS para bactérias e inativadas por uma hora a 60 °C. A seguir, a concentração foi ajustada como descrito acima, e reservadas para opsonização e realização dos ensaios.

#### 3.8.2 Obtenção do material opsonizante e dosagem de anticorpos

Para opsonização das bactérias foi usado *pool* soro humano normal (SHN) fresco. No nosso estudo, foi utilizado um *pool* de soro de 20 indivíduos sadios (sem

doença infecto-contagiosa ou congênita). O soro foi armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em alíquotas de 0,5 mL.

Antes de ser utilizado esse material foi avaliado para a concentração de IgG e IgM totais pela técnica de imunodifusão radial quantitativa (IDRQ). Prepara-se agarose a 1%, contendo volumes e concentrações específicas de anticorpos para detecção, em PBS 7,4, que é transferida para banho-maria a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a estabilização da temperatura. Para dosagem de anticorpos totais, para cada 6 mL de agarose, foram colocados 70  $\mu\text{L}$  de anti-IgG humano ou 30  $\mu\text{L}$  de anti-IgM humano, ambos desenvolvidos em carneiro (Biolab, SP, Brasil).

Para a dosagem de IgG total foi utilizado soro padrão Beckman Coulter™ nas concentrações de 2385 a 37,26 mg/dL, para a obtenção da curva padrão. Para a dosagem de IgM total também foi utilizado soro padrão Beckman Coulter™ nas concentrações de 192 a 3 mg/dL, para a obtenção da curva padrão de IgM. Dois controles foram utilizados a partir de soros de pacientes sadios, diluídos em 1:20 e 1:40 para a dosagem de IgG e utilizados puros e diluídos 1:2 para a dosagem de IgM. As demais amostras a serem testadas também foram diluídas a 1:20 e 1:40 (IgG) e utilizadas puras e diluídas 1:2 na dosagem de IgM. Em ambos os testes, foram aplicados 5  $\mu\text{L}$  de amostra por halo.

A seguir, as amostras foram incubadas em câmara úmida por 48 horas (IgG) ou 72 horas (IgM) a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, os diâmetros dos halos de precipitação foram medidos e um gráfico com a curva padrão para a obtenção dos valores da concentração de IgG e IgM de cada amostra foi construído. Os valores obtidos das concentrações das amostras no gráfico foram multiplicados pelos valores de suas respectivas diluições para a obtenção do valor real da concentração de IgG e IgM nos soros. Os resultados finais foram calculados no programa Graphpad Prism e expressos em mg/dL (ANEXO C). Para composição do SHN foram excluídas as amostras que apresentaram alterações em qualquer uma das duas classes de imunoglobulinas.

### 3.8.3 Oponização e fagocitose das EPEC

Uma alíquota do SHN foi utilizada para a oponização das EPEC realizada segundo a técnica descrita por Bellinati-Pires e colaboradores (1989).

O SHN foi misturado com volumes apropriados de suspensão bacteriana em meio RPMI 1640, para concentrações finais de  $2 \times 10^7$  bactérias/mL e 10% de oponinas. Uma outra suspensão bacteriana foi preparada em meio RPMI, sem oponinas, mantendo a mesma concentração final de bactérias, para servir como suspensão controle contendo bactérias não oponizadas (Tabela 2). Após 30 minutos de incubação à 37 °C as suspensões foram imediatamente utilizadas nos ensaios.

**Tabela 2:** Oponização das EPEC.

	<b>Tubo 1</b> (bactérias oponizadas)	<b>Tubo 2</b> (bactérias não oponizadas)	<b>Tubo 3</b> (controle)
Suspensão bacteriana	80 µL	80 µL	-----
RPMI	370 µL	420 µL	500 µL
Oponinas	50 µL	-----	-----
Incubação	30 minutos / 37 °C		

Após o período de oponização das EPEC, volumes iguais de suspensão de bactérias dos tubos 1 e 2 foram misturados separadamente com suspensões celulares contendo  $2 \times 10^6$  fagócitos em tubos cônicos de plástico de 15 mL, com volume ajustado e padronizado de 500 µL (Tabela 3). A suspensão das EPEC oponizadas ou não, e as células foram incubadas por 30, 60, 90 e 120 minutos, sob agitação, a 37 °C, para que as células e as bactérias pudessem interagir e favorecer a fagocitose.

**TABELA 3:** Fagocitose das EPEC.

	<b>Tubo 01</b> (bactérias opsonizadas)	<b>Tubo 02</b> (bactérias não opsonizadas)	<b>Tubo 03</b> (controle)
Suspensão bacteriana	80 µL (2x10 <sup>7</sup> bactérias)	80 µL (2x10 <sup>7</sup> bactérias)	-----
RPMI	370 µL	420 µL	500 µL
Opsoninas	50 µL	-----	-----
Suspensão de células em RPMI	500 µL (2x10 <sup>6</sup> céls.)	500 µL (2x10 <sup>6</sup> céls.)	500 µL
Incubação	30, 60, 90 e 120 minutos / 37 °C / sob agitação		

No tempo de 30 minutos avaliou-se fagocitose das bactérias e nos demais tempos (60', 90', 120') fez-se a análise da viabilidade das EPEC. Após cada um desses períodos a suspensão contendo bactérias foi lavada 3 vezes (centrifugação – 1500 rpm/10 minutos/25 °C) em PBS (pH=7,4), contendo 55 mg/mL de gentamicina para eliminar as bactérias extracelulares. Após as lavagens, as células foram ressuspendidas em 200 µL de Triton X100 (Sigma, St. Louis, EUA) para romper as membranas plasmáticas e recuperar as bactérias. As bactérias recuperadas foram então diluídas serialmente (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) e depois plaqueadas em ágar sólido TSA. A contagem da porcentagem de morte das bactérias foi calculada pela seguinte fórmula:

$$100 - \left[ \left( \frac{\text{CFU no tempo analisado}}{\text{CFU no tempo 0}} \right) \times 100 \right].$$

A microscopia confocal (Anexo D) foi usada como abordagem diferencial para ilustração da atividade bactericida. Após centrifugação, o sedimento foi corado, por um minuto apenas, com 200 µL de “acridine orange” (AO – 14,4 mg/L), em seguida, lavados com PBS (centrifugação – 1500 rpm/10 minutos/4 °C) e mantidos em banho de gelo. A observação em microscópio foi realizada com uma gota a fresco na lâmina, em óleo de imersão no microscópio óptico com luz ultravioleta (aumento 1000x). Esta técnica e o cálculo de determinação da atividade microbicida acima foram realizados conforme descrito por Bellinati-Pires e colaboradores (1992).

### 3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS

Para esta avaliação utilizamos os sobrenadantes das culturas celulares após os tratamentos. Esse material foi submetido a uma dosagem de citocinas pela técnica de ELISA para cada uma das citocinas avaliadas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12), conforme protocolo especificado pelo fabricante (BD Biosciences, EUA).

Foram utilizados para a captura de antígenos 100  $\mu$ L de anticorpos monoclonais específicos para as citocinas: anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$  e anti-IL-12, em concentrações específicas (1 ng/mL) para cada citocina e incubadas durante a noite em câmara úmida refrigerada (4 °C). Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS/Tween 0,05% 3 vezes e bloqueadas por duas horas com 200  $\mu$ L de uma solução de BSA a 1% e sacarose 5% em PBS. Após este período as placas foram lavadas novamente, e 50  $\mu$ L de amostras ou da curva padrão de citocinas, em duplicata, foram colocadas para incubação por mais 2 horas em temperatura ambiente. Após nova lavagem foram adicionados 100  $\mu$ L de um segundo anticorpo policlonal biotilado anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$  e anti-IL-12, e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas novamente e incubadas com uma solução de *Horseradish Peroxidase* conjugada à avidina (Genzyme Diagnostics) 1,25 ng/mL diluída em 1% BSA/PBS, durante 20 minutos a 37 °C. Após 3 lavagens com PBS, foram adicionados 100 $\mu$ L de reagente tetrametilbenzidina (TMB® Sigma) para revelar a reação. Após cerca de 30 minutos a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 30% e a absorbância foi lida em um comprimento de onda de 450 nm no leitor de ELISA.

A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão feita com as respectivas citocinas recombinantes, utilizadas em uma diluição seriada a partir de 1.000 até 16 pg/mL. Os resultados da absorbância foram analisados por regressão linear no programa GraphPad Prism Software Versão 4.0. As concentrações de citocinas das amostras apresentam-se em pg/mL.

### 3.10 EXPRESSÃO GÊNICA DA GP91<sup>PHOX</sup>

#### 3.10.1 Extração do RNA Total

Para a obtenção do RNA total foi utilizado o método TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, CA, EUA). Após os tratamentos as células (THP-1, PBMC e neutrófilos) foram ajustadas na proporção de  $5-10 \times 10^6$  células para 1 mL de Trizol. Em seguida foram centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos adicionando-se 200 µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 (v:v) seguindo-se de nova homogeneização. Após 10 minutos no gelo, a mistura foi novamente centrifugada a 12.000 xg por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para outro tubo contendo o mesmo volume de isopropanol (Merck, SP, Brasil). As soluções foram então agitadas até a completa homogeneização, armazenadas a -20 °C por no mínimo 30 minutos e centrifugadas novamente a 14.000 xg por 20 minutos a 4 °C. O sedimento resultante é lavado com 600 µL de etanol gelado a 70% e submetido à nova centrifugação de 14.000 xg por 15 minutos a 4 °C. Após esta centrifugação o sobrenadante é descartado e o RNA dissolvido em 15 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e estocado a -70 °C. A análise do RNA para determinar a concentração e grau de pureza foi realizada no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, DE, EUA).

#### 3.10.2 Transcrição Reversa

Para fazer a transcrição reversa foi utilizado o kit TaqMan<sup>®</sup> Reverse Transcription (Applied Biosystems, NY, EUA), onde se realiza a produção do cDNA. A reação é feita em duas etapas segundo o esquema abaixo (Tabela 3). Entre a primeira e a segunda etapa as amostras ficam em banho de gelo por 1 minuto. Durante esse momento adiciona-se o mix da segunda etapa também descrito no quadro abaixo. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5% contendo 1 µg/mL de brometo de etídio e visualizadas em transluminador.

**TABELA 4:** Reação de transcrição reversa – reagentes e ciclos usados.

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

### 3.10.3 PCR em tempo real

Antes do procedimento, padronizam-se as concentrações dos reagentes do mix e dos primers específicos forward e reverse (Tabela 5). A concentração de cada primer no mix da reação foi de 5 pmol/µL. Os demais reagentes usados seguiram o protocolo do sistema de “Real-time PCR” utilizando SYBR Green (Applied Biosystems, NY, EUA) (Tabela 6). Os ciclos de amplificação foram programados no 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, NY, EUA).

**TABELA 5:** Genes e primers para avaliação por Real Time PCR.

Proteína/Gene	“Primers”	Seqüência
gp91phox ( <i>CYBB</i> )	Foward	5'-ttg tgg aaa ccc tcc tat ga -3'
	Reverse	5'-aaa acc gca cca acc tct ca-3'
β-actina	Foward	5'- tca ccg agc gcg gct-3'
	Reverse	5'-taa tgt cac gca cga ttt ccc-3'

**TABELA 6:** Reação de PCR em tempo real.

Corrida de amplificação	Curva de dissociação
5 µL SYBR Green Master Mix	
3 µL (2µg) de cDNA	-----
2 µL par de primers (5pmol/µL cada)	
Ciclo	Ciclo
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"

Após o término da PCR, fez-se a análise dos dados com base na curva de dissociação gerada durante a corrida, usando o software 7000 System SDS Software 1.3 (Applied Biosystems, CA, USA) para determinação do nível de expressão gênica das proteínas estudadas.

Foi feita uma avaliação relativa da amplificação gênica realizada pela PCR em tempo real, analisando a relação do Ct (Cycle Threshold) obtido nas amostras tratadas em relação ao Ct das amostras controle, não tratadas. O Ct é o primeiro ciclo de amplificação, no qual o "amplicon" de DNA é detectado acima da linha basal. Desta forma, os possíveis fatores interferentes associados aos estágios tardios da reação são minimizados. A partir dos valores de Ct encontrados, foi calculado o valor do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, 2001), onde:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(1 + E)^{-\Delta Ct \text{ do gene alvo}}}{(1 + E)^{-\Delta Ct \text{ do gene controle}}}$$

com: E representando a eficiência da reação de PCR e  $\Delta Ct$  a diferença entre o valor de Ct da amostra tratada e da amostra controle para este gene. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação, a qual foi realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de primer ou qualquer outro produto inespecífico.

Além da análise computacional, para uma segunda avaliação fez-se uma corrida eletroforética em gel de agarose a 3%, usando 10 µL de cada reação e 4 µL de azul de bromofenol a 1% para acompanhamento da corrida (Anexo E).



### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Apesar dos dados serem paramétricos, não foi realizado o teste “t” de Student para comparação de dois grupos, pois a análise baseia-se na comparação de médias de várias amostras. Nesse caso, pode haver um grande número de pares a ser avaliado. Para tanto em todas as análises realizadas, procedeu-se inicialmente ao teste de Bartlett, para a verificação da existência ou não de homogeneidade entre as variâncias, seguida da análise de variância (ANOVA). Este teste permite a análise de variância para comparar simultaneamente amostras de variáveis contínuas com distribuição normal e cujas variâncias não diferem significativamente entre si. Por último, procedeu-se o teste de Tukey, para realizar a comparação múltipla. O nível de significância adotado foi de 5% , 1% ou 0,1%, ou seja, a probabilidade de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$  foram capazes de revelar a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os dados dos diferentes grupos (da Silva, 2003). Todas as análises foram realizadas no Software Prism 4.00 (GraphPad Softawer Inc.)



**4 RESULTADOS**

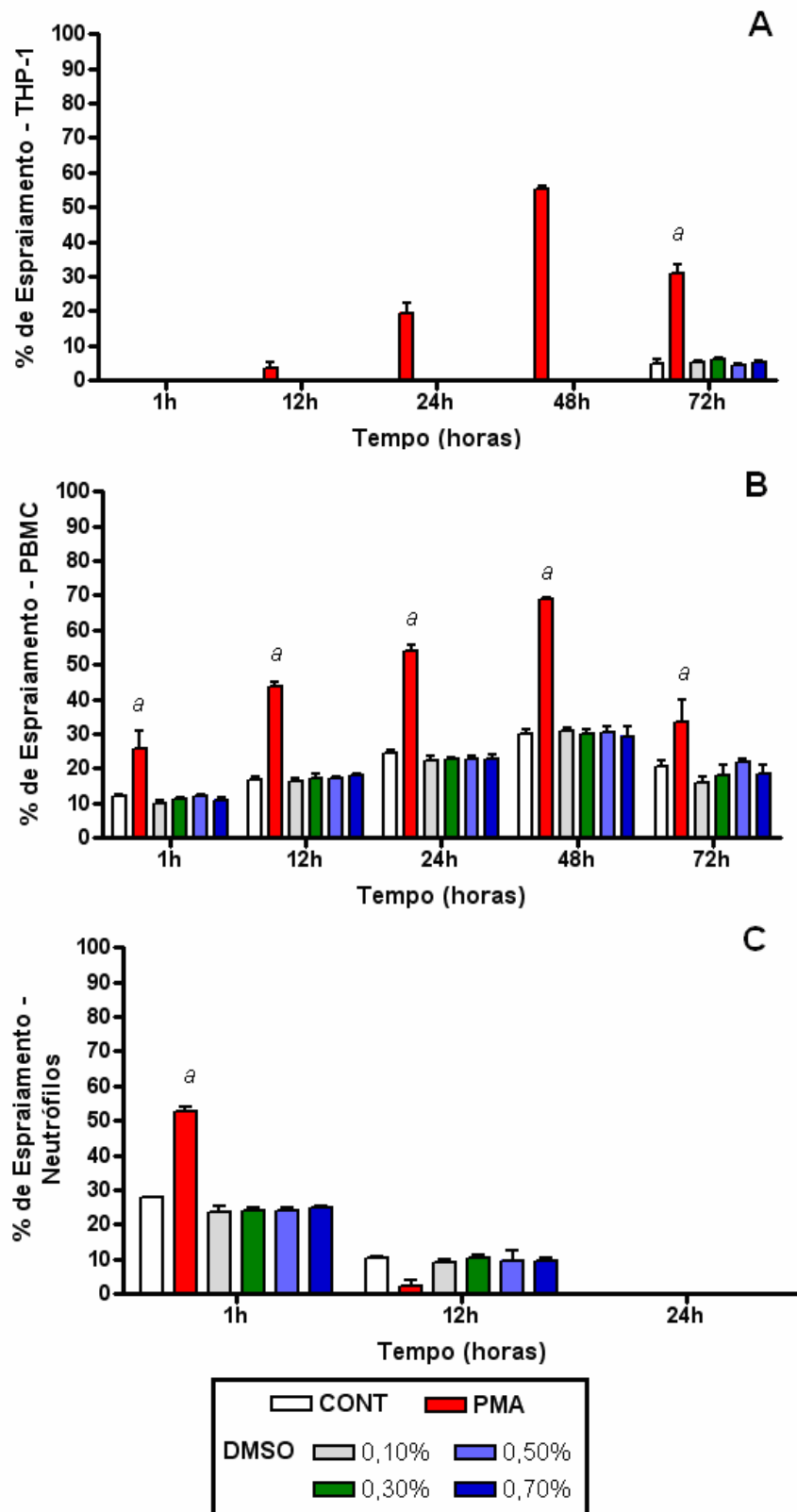
Para este estudo participaram 7 indivíduos saudáveis (ausência de doença infecto-contagiosa ou congênita confirmada), com idades entre 22-30 anos. Os ensaios efetuados com esses indivíduos foram também realizados com as células de linhagem THP-1.

#### **4.1 EFEITO DO DMSO E BAY 41-2272 SOBRE O ESPRAIAMENTO**

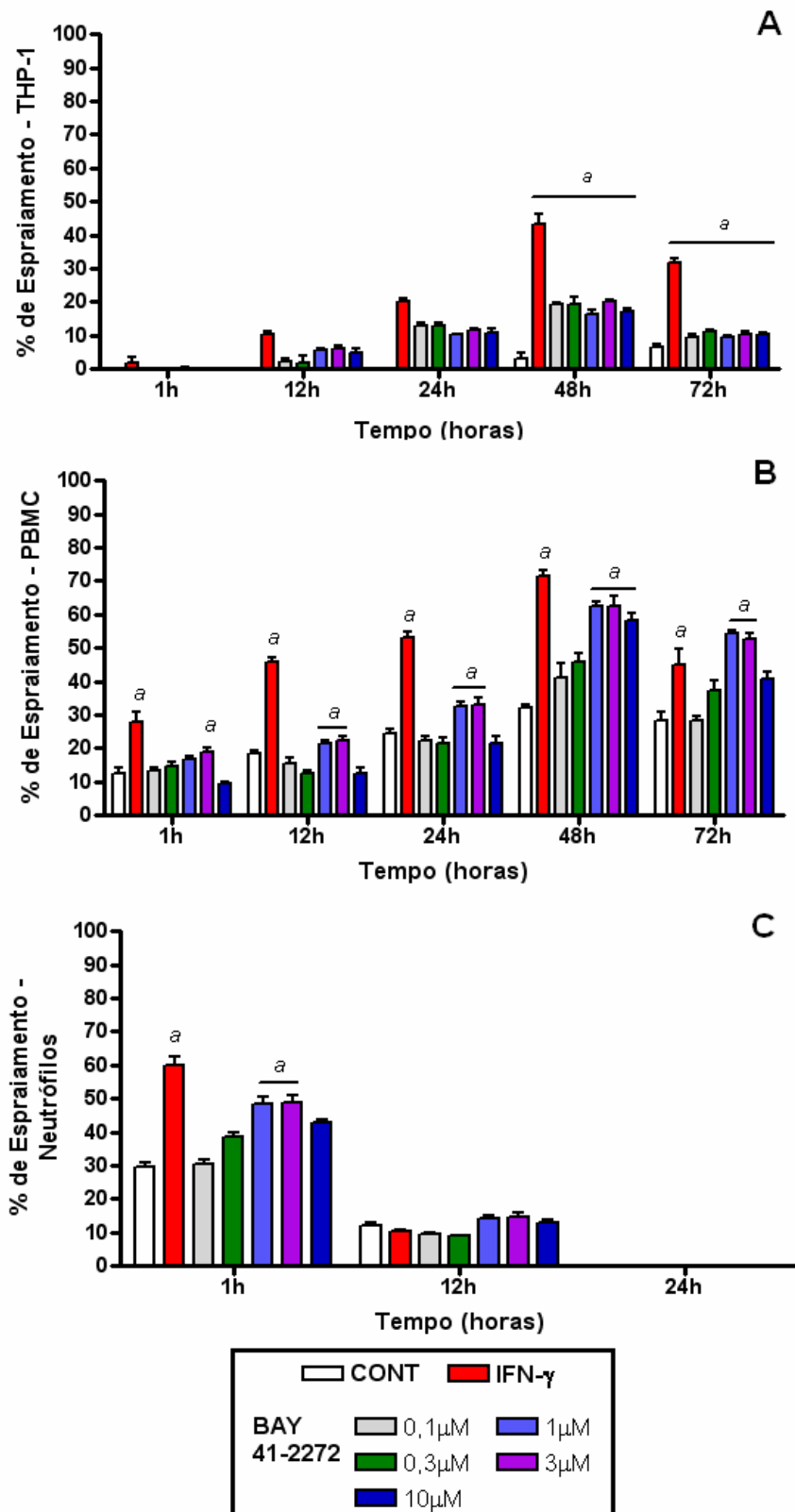
Nesta primeira etapa do estudo, verificamos a capacidade de espraçamento das células após os tratamentos com o fármaco e seu diluente.

Iniciamos pela avaliação do tratamento das células com DMSO. O DMSO não se mostrou capaz, nas concentrações avaliadas, de ativar as células, quando os valores foram comparados ao controle não tratado (ANOVA com  $p > 0,05$ ,  $n=4$ ) (Figura 7). O tratamento com PMA foi o único que resultou num aumento significativo na porcentagem de espraçamento de todos os tipos celulares estudados (ANOVA,  $P < 0,05$ ,  $n=4$ ) (Figura 7).

Uma vez estabelecido este protocolo, avaliamos também o espraçamento celular das células tratadas com o BAY 41-2272 (0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ), pelos mesmos períodos de tempo acima citados. O tratamento com BAY 41-2272 aumentou significativamente (ANOVA,  $P < 0,05$ ,  $n=4$ ) a atividade de espraçamento das células em relação ao controle não tratado, mas não em relação ao IFN- $\gamma$  (ANOVA,  $P < 0,05$ ,  $n=4$ ), em todos os tipos celulares (Figura 8). Esse aumento foi mais evidente nas THP-1 a partir das 48 horas (Figura 8A) de tratamento e dos PBMC em todos os tempos (Figura 8B), ambos em relação às concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  do fármaco. No caso dos neutrófilos só foi possível fazer a avaliação até as primeiras 12 horas de cultura, para o tratamento com o BAY 41-2272 e para o tratamento com DMSO, pois a viabilidade das células após esse tempo foi quase zero (ANEXO B).



**FIGURA 7:** DMSO não induz espreamento das THP-1, PBMC e neutrófilos. Análise da porcentagem de espreamento de células THP-1 (A), PBMC (B) e neutrófilos (C), tratadas por 1h, 12h, 24h, 48h ou 72h com DMSO. Resultados mostrados em MÉDIA  $\pm$  SEM de 4 experimentos independentes, em triplicata; *a* para ANOVA  $p < 0,05$  em relação ao controle.

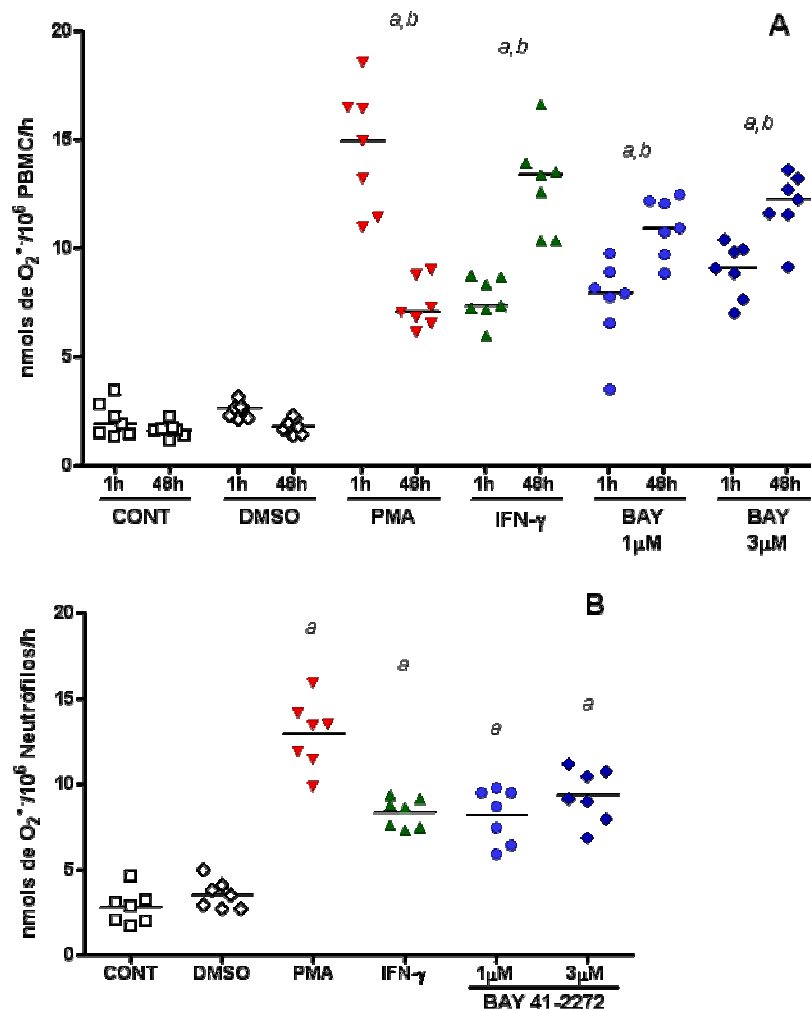


**FIGURA 8:** BAY 41-2272 induz o espreadimento. Análise da porcentagem de espreadimento de células THP-1 (A), PBMC (B) e neutrófilos (C), tratadas por 1h, 12h, 24h, 48h ou 72h com BAY 41-2272 (0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M). Resultados mostrados em MÉDIA  $\pm$  SEM de 4 experimentos independentes, em triplicata; a para ANOVA  $p < 0,05$  em relação ao controle.

## 4.2 EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO

Uma vez confirmado o efeito do fármaco sobre o espriamento, passamos a investigar o seu efeito na produção de ânion superóxido.

Verificamos que o tratamento com BAY 41-2272 (1  $\mu$ M ou 3  $\mu$ M) aumentou significativamente (ANOVA,  $P < 0,001$ ,  $n=7$ ) a liberação desse reativo pelas células (Figura 9). No caso dos PBMC, o tratamento por 48 horas resultou num aumento maior da produção do superóxido em comparação ao de uma hora (ANOVA,  $P < 0,01$ ,  $n=7$ ) (Figura 9A).



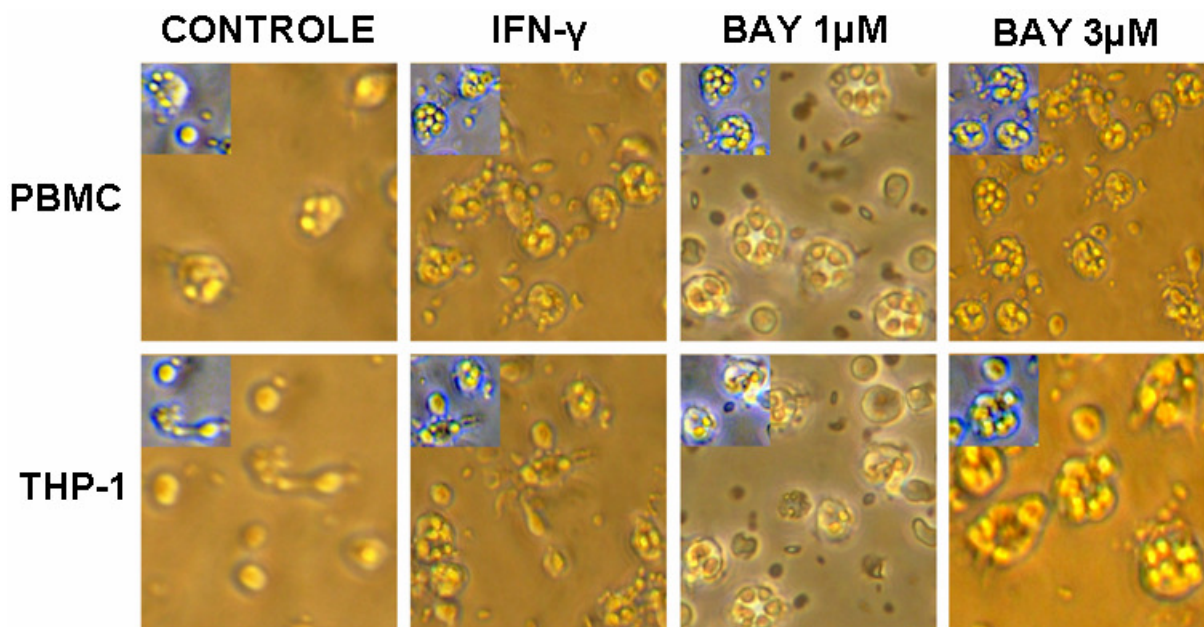
**FIGURA 9:** BAY 41-2272 induz a produção de ânion superóxido por PBMC e neutrófilos. Avaliação da produção de ânion superóxido pela redução de citocromo *c* por PBMC (A) e neutrófilos (B) tratados com BAY 41-2272 (1  $\mu$ M ou 3  $\mu$ M) por 1h ou 48h. Resultados mostrados em MÉDIA  $\pm$  SEM de 7 indivíduos, com 6 experimentos independentes por amostra; *a* para ANOVA  $p < 0,001$  em relação ao controle; *b* para ANOVA  $p < 0,01$  em relação aos tempos de estímulo.

### 4.3 EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A FAGOCITOSE

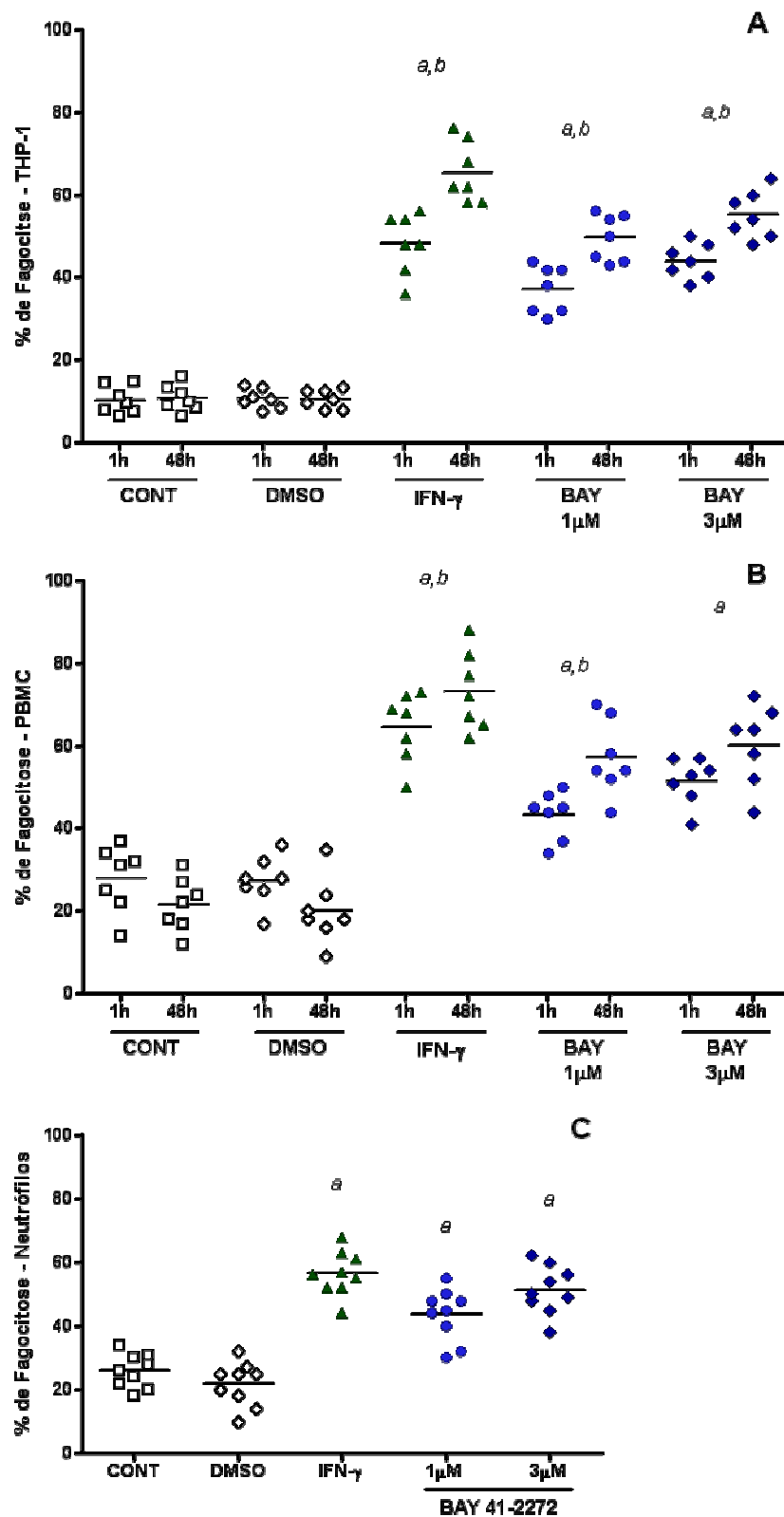
Continuando os experimentos de ativação celular pelo fármaco, avaliamos a fagocitose de zymosan pelas células THP-1, PBMC e neutrófilos.

Avaliamos por microscopia de contraste de fase o número de células que fagocitaram ou não, sendo feito também o registro fotográfico. Verificamos que há um aumento não só na proporção de células que fagocitaram, mas também quanto no número de partículas englobadas por células (Figura 10).

Após as contagens, constatamos que o tratamento com BAY 41-2272 (1  $\mu$ M ou 3  $\mu$ M) aumentou significativamente (ANOVA,  $P < 0,001$ ,  $n=7$ ) a atividade fagocítica em todas as células (Figura 11). No caso das THP-1, o tratamento por um tempo de 48 horas gerou um aumento maior da fagocitose em comparação ao de uma hora (ANOVA,  $P < 0,01$ ,  $n=7$ ) (Figura 11A), da mesma forma que aos PBMC tratados com 1  $\mu$ M do fármaco (Figura 11B).



**FIGURA 10:** BAY 41-2272 induz o aumento da atividade fagocítica de células THP-1, PBMC e neutrófilos. Microscopia de contraste de fase da avaliação da fagocitose de partículas de Zymozan ( $1 \times 10^7$ /mL) por células THP-1 e PBMC tratadas com BAY 41-2272 1  $\mu$ M ou 3  $\mu$ M por 48h.



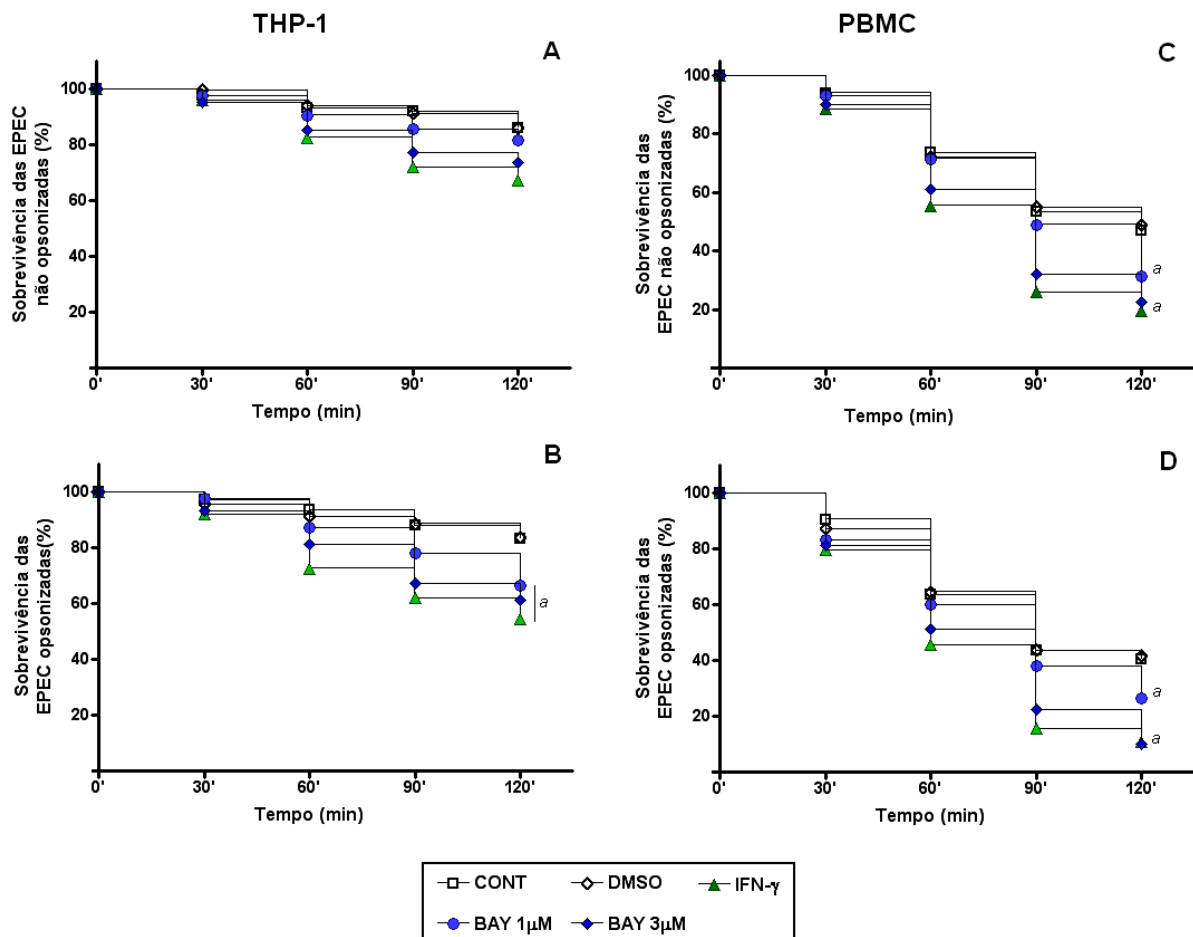
**FIGURA 11:** BAY 41-2272 aumenta a atividade fagocítica. Avaliação da porcentagem de fagocitose de partículas de Zymozan ( $1 \times 10^7$ /mL) por células THP-1 (A), PBMC (B) e neutrófilos (C) tratadas com BAY 41-2272 (1 $\mu$ M ou 3 $\mu$ M) por 1h ou 48h. Resultados mostrados em MÉDIA  $\pm$  SEM de 7 indivíduos, com 6 experimentos independentes por amostra; *a* para ANOVA  $p < 0,001$  em relação ao controle; *b* para ANOVA  $p < 0,01$  em relação aos tempos de estímulo.



#### 4.4 EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A ATIVIDADE MICROBICIDA

A seguir analisamos o comportamento dos fagócitos em relação a patógenos, nesse caso *E. coli* enteropatogênica, após o tratamento com o fármaco, testando as atividades fagocítica e microbicida.

Interessantemente, não observamos o aumento significativo da fagocitose (tempo de 30') em nenhum dos tipos celulares (Figura 12). No entanto, o tratamento com BAY 41-2272 (1 $\mu$ M ou 3 $\mu$ M) aumentou significativamente (ANOVA,  $P < 0,01$ ,  $n=4$ ) a atividade microbicida (Figura 12 – tempos de 60', 90' e 120').



**FIGURA 12:** BAY 41-2272 aumenta a capacidade microbicida de PBMC e células THP-1. Efeito do BAY 41-2272 no potencial microbicida de THP-1 e PBMC co-cultivados com EPEC opsonizadas (B-D) ou não (A-C). A porcentagem de sobrevivência das bactérias representa a razão das CFU formadas nos tempos avaliados pelo número inicial de CFU. Resultados mostrados em MÉDIA  $\pm$  SEM de 4 experimentos independentes; a para ANOVA  $p < 0,01$  em relação ao controle.

#### 4.5 EFEITO DO BAY 41-2272 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Um dos fatores determinantes para a ativação de fagócitos é a presença e a produção de citocinas. Para tanto avaliamos nos sobrenadantes de células THP-1, PBMC e neutrófilos, após cultura de 48 ou 1 hora, a produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Tabela 7).

**TABELA 7:** Valores das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no sobrenadante das culturas.

		<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (ng/mL)	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> (ng/mL)	<b>IL-12</b> (ng/mL)
<b>THP-1</b>	CONTROLE	0,001	<0,016	0,007
	DMSO	0,001	<0,016	<0,016
	IFN- $\gamma$	<b>0,932</b>	<b>1,243</b>	<0,016
	BAY 1 $\mu$ M	<b>0,935</b>	<b>1,241</b>	<0,016
	BAY 3 $\mu$ M	<b>0,735</b>	<0,016	<0,016
<b>PBMC</b>	CONTROLE	0,001	<0,016	0,009
	DMSO	0,001	<0,016	<0,016
	IFN- $\gamma$	<b>0,918</b>	<b>1,234</b>	0,010
	BAY 1 $\mu$ M	<b>0,913</b>	<b>1,255</b>	0,004
	BAY 3 $\mu$ M	<b>0,733</b>	<0,016	0,001
<b>Neutrófilos</b>	CONTROLE	0,001	0,037	<0,016
	DMSO	0,001	<0,016	<0,016
	IFN- $\gamma$	<b>0,899</b>	<b>1,278</b>	<0,016
	BAY 1 $\mu$ M	<b>0,918</b>	<b>1,319</b>	<0,016
	BAY 3 $\mu$ M	<b>0,708</b>	<0,016	0,002

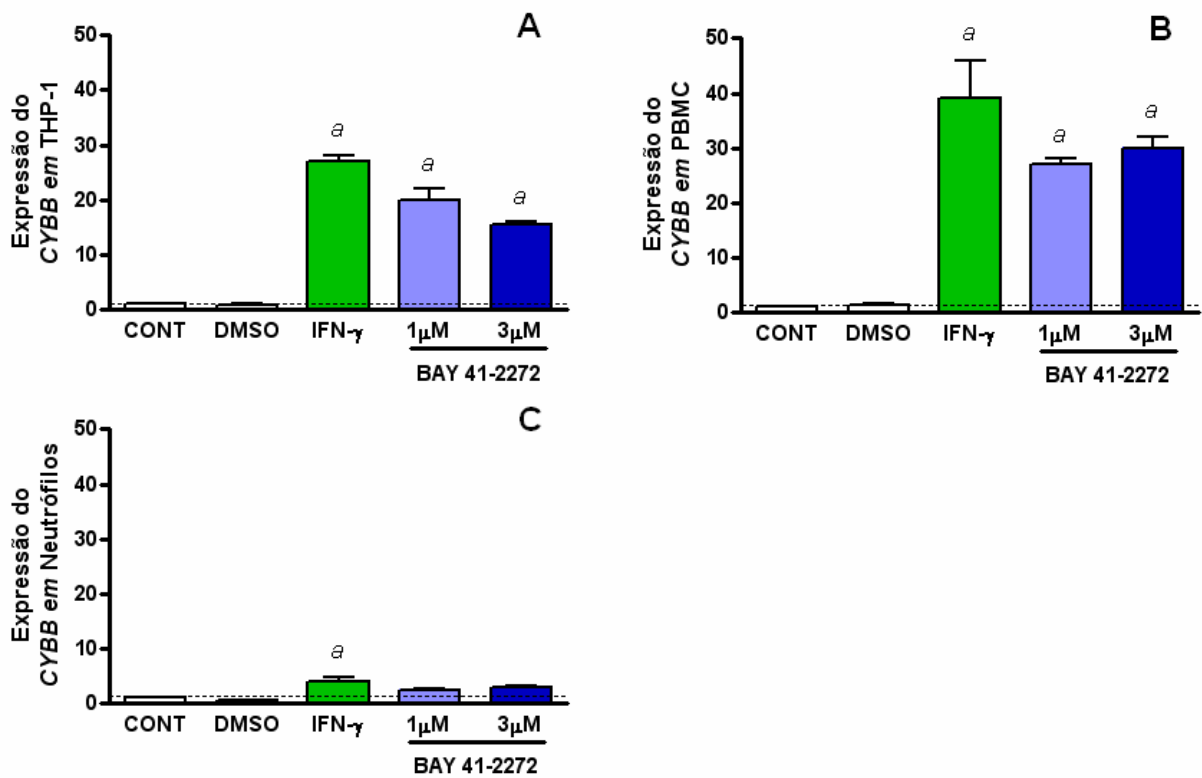
Os valores de referência da curva também são utilizados quando os cálculos não resultam na quantidade precisa de citocina produzida. Quando a absorbância acusa um valor abaixo dos valores da curva utilizamos <0,016 ng/mL.

Podemos constatar que não houve a produção de IL-12 em nenhum dos tipos celulares. As células tratadas com IFN- $\gamma$  (100 U/mL) e BAY 41-2272 na concentração de 1  $\mu$ M foram as que tiveram a produção de IFN- $\gamma$  observada, tendo os demais grupos ficado abaixo do valor mínimo da curva (0,016 ng/mL). Houve um aumento significativo apenas na produção de TNF- $\alpha$  em todos os grupos tratados com as duas concentrações do fármaco, tendo o tratamento com 1 $\mu$ M alcançado valores semelhantes ao do tratamento com IFN- $\gamma$ . Portanto, o tratamento com o BAY 41-2272 induziu a produção de TNF- $\alpha$ .

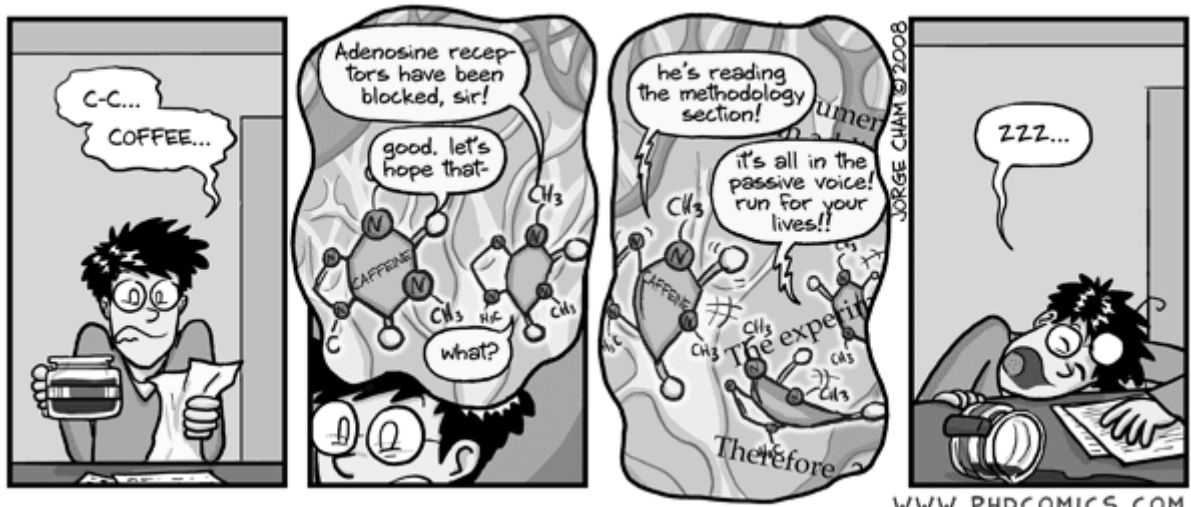
#### 4.6 EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A EXPRESSÃO DE GP91<sup>PHOX</sup>

Para uma segunda etapa de experimentos, avaliamos a expressão gênica de componentes do sistema NADPH oxidase, no caso o gene *CYBB* codificador da gp91<sup>phox</sup>.

Verificamos que o tratamento com o BAY 41-2272 (1  $\mu$ M ou 3  $\mu$ M) aumentou significativamente (ANOVA,  $P < 0,01$ ,  $n = 3$ ) a expressão do gene *CYBB* nas THP-1 e PBMC (Figura 13). No entanto, os neutrófilos tiveram um aumento na expressão gênica apenas com o tratamento com IFN- $\gamma$  (100 U/mL) (Figura 13C).



**FIGURA 13:** BAY 41-2272 aumenta a expressão do gene *CYBB* em PBMC e THP-1. Avaliação da expressão do gene *CYBB* em células THP-1 (A), PBMC (B) e neutrófilos (C) tratados com BAY 41-2272 (1  $\mu$ M ou 3  $\mu$ M) por 1h ou 48h. Resultados mostrados em MÉDIA  $\pm$  SEM de 3 experimentos independentes em triplicata; a para ANOVA  $p < 0,01$  em relação ao controle.



## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que o BAY 41-2272 administrado agudamente, tratamento de uma hora, ou por um período de 48 horas, nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  ou 3  $\mu\text{M}$  interferiu com a atividade de PBMC e neutrófilos circulantes, e células da linhagem THP-1. Mais especificamente observou-se que o BAY 41-2272 aumentou o *burst oxidativo*, a fagocitose, a atividade microbida, a produção de TNF- $\alpha$  e a expressão gênica da gp91<sup>phox</sup> destas células após o tratamento *in vitro*.

Sendo o BAY 41-2272 um composto que não pode ser diluído em água, não é facilmente diluído em álcool, mas possui boa solubilidade em DMSO (Dimetilsulfóxido), este último composto foi o solvente usado nos nossos experimentos para diluição do fármaco. Estudos mostram que o DMSO pode, em concentrações altas, ter ação citotóxica (Da Violante, et al., 2002). Para excluir essa possibilidade, fez-se uma avaliação da viabilidade das células tratadas com várias concentrações desse solvente orgânico (0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%). Pode-se observar que as concentrações de DMSO usadas para diluir o fármaco não interferem na viabilidade de nenhum tipo celular usado nos experimentos (ANEXO B).

Além da toxicidade em doses excessivamente altas, o DMSO em baixas concentrações pode ativar alguns tipos celulares (Lee, et al., 2005). Para eliminar esta outra variável, realizou-se um experimento para avaliar a possível ativação das células pelo solvente em questão. Após o tratamento com as mesmas concentrações de DMSO usadas para avaliar a citotoxicidade, foi avaliada a aderência e espraiamento em lâminas de vidro, uma vez que estes são sinais de ativação de fagócitos e bons critérios para essa avaliação (Enane, et al., 1993). Os resultados mostraram que as concentrações de DMSO usadas para diluir o BAY 41-2272 não são suficientes para ativar as células (Figura 6). No caso das THP-1, não houve um nível basal de ativação registrado (Figura 6A), provavelmente pelo fato dessas células estarem num estado precoce de diferenciação e precisarem de estímulos mais fortes e/ou específicos para iniciarem sua diferenciação e serem ativadas (Auwerx, 1991). Todos esses resultados mostram que o DMSO não interferiu nos resultados obtidos. Todos os efeitos observados e analisados são relativos ao tratamento com o BAY 41-2272.

Em vista desses experimentos com o uso do DMSO puro, achou-se conveniente realizar os mesmos protocolos usando várias concentrações de BAY 41-2272. Verificou-se que o tratamento com BAY 41-2272 não diminui a viabilidade das células em cultura em relação aos grupos controle (ANEXO B). Portanto, qualquer efeito negativo, não pode ser relacionado ao fato das células estarem morrendo. No entanto, com o passar do tempo há uma diminuição na viabilidade em todos os grupos tratados, com BAY 41-2272 ou com IFN- $\gamma$ . Provavelmente, essa diminuição na viabilidade é resultado da ativação das células, uma vez que todas foram ativadas pelas concentrações testadas (Figura 8). Um dos mecanismos pelo qual a ativação celular pode levar à diminuição da viabilidade celular é a indução da expressão de moléculas de superfície indutoras de apoptose, como Fas, e ativação de caspases. Essas moléculas são expressas, geralmente quando há uma falta de estimulação ou quando a célula chega ao limiar máximo de sua ativação (Fukumoto, et al., 1999).

Com os resultados de espraiamento, podemos observar que o BAY 41-2272 mostrou uma ativação celular quanto a motilidade e funções morfológicas das células. Relacionado a isso está a principal função dos fagócitos, que é englobar e eliminar microrganismos estranhos e potencialmente danosos ao organismo. Esta eliminação depende largamente da ativação do *burst* oxidativo, caracterizado pela geração de ânion superóxido e de espécies reativas de oxigênio. Tendo Oliveira-Junior e colaboradores (2007) demonstrado que o BAY 41-2272 aumenta a produção de superóxido por células THP-1, avaliou-se a produção desse reativo por neutrófilos e PBMC sob o mesmo tratamento.

O BAY 41-2272 aumentou significativamente a produção de superóxido pelos dois tipos celulares em relação aos controles não tratados (Figura 9). Como esperado os neutrófilos produziram maior quantidade de superóxido (Figura 9B), quando comparados aos PBMC (Figura 9A). Essa maior produção ocorre pelo fato dos neutrófilos serem células totalmente maduras, tendo uma maior e mais rápida resposta aos estímulos. Nos tratamentos de 48 horas o BAY 41-2272 gerou uma produção de superóxido menor do que o grupo tratado com IFN- $\gamma$ , após o tempo de 48 horas. Essa citocina é conhecidamente ativadora de fagócitos, possuindo receptores e vias de sinalização intracelular específicas e naturais (Skorokhod, et al.,

2007), enquanto o BAY 41-2272 é um fármaco sintético com uma via de ativação ampla e generalizada. No entanto no tempo de uma hora o fármaco teve uma resposta mais elevada, mostrando que as vias por ele ativadas foram capazes de montar o complexo NADPH oxidase de uma forma muito eficiente.

Um aumento de *burst* oxidativo com conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio é uma característica de neutrófilos ativados (Yamamoto, et al., 2002). Têm sido amplamente estudados os sinais que desencadeiam o *burst* oxidativo (Hu, et al., 1999; Thelen, et al., 1993). Sabe-se assim, que este pode ser iniciado quer pela ligação de agonistas como fMLP, a anafilatoxina C5a, o fator ativador de plaquetas (PAF) e o leucotrieno B4 (LTB4) aos receptores existentes na membrana celular, quer pela ativação da PKC pelo PMA. Já se relatou o envolvimento da sGC e as vias subseqüentes de transdução de sinais com a proteína kinase C (PKC) (Khare, et al., 1994; Aggelidou, et al., 2002). Esta enzima promove a fosforilação de proteínas específicas denominadas "PHagocyte OXidases" (gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox, p67phox) que, conjuntamente, montam o complexo NADPH oxidase, gerador das espécies reativas de oxigênio (Ueyama, et al., 2007). Portanto, sendo BAY 41-2272 um ativador de sGC, podemos sugerir que esse aumento na produção de superóxido pode estar relacionado com a ativação da PKC via cGMP. Além disso, a ativação de proteínas kinases explicaria a resposta elevada após uma hora apenas de tratamento, uma vez que o aumento da expressão gênica com apenas uma hora é inexpressivo para a maioria dos genes, inclusive os genes das proteínas da NADPH oxidase (Newburger, et al., 1988). Esse aumento seria então semelhante ao resultante pelo tratamento com PMA, ou seja, aproveitando as proteínas já disponíveis no citoplasma e membrana, ativando-as e promovendo o acoplamento das mesmas.

Os mesmos padrões de ativação celular, ou melhor, de aumento de resposta encontrados em relação ao *burst* oxidativo, foram mostrados em relação à fagocitose (Figura 11). A atividade fagocítica é um ponto muito importante a ser avaliado nessas células, antes mesmo da produção dos reativos de oxigênio. Sendo a fagocitose geralmente o estímulo natural primário para a plena atividade dos fagócitos, avaliou-se o potencial dessas células após a incubação com o fármaco. O tratamento com o BAY 41-2272 (1  $\mu$ M e 3  $\mu$ M) aumentou a atividade fagocítica em

relação ao controle normal, mas assim como na produção de superóxido, esse parâmetro também foi menor em relação ao tratamento com IFN- $\gamma$  (Figura 10).

Uma vez que é importante avaliar os efeitos agudo e prolongado do fármaco, duas formas de tratamento foram aplicadas para as células THP-1 e PBMC, em relação ao tempo. O primeiro de uma hora e o segundo de 48 horas. As células THP-1 apresentaram um aumento na atividade fagocítica em relação aos tempos de tratamento (Figura 11A). Essa linhagem de células encontra-se em estágio muito precoce de diferenciação, portanto necessita de um maior tempo de estímulo (48h) para maturarem a ponto de aumentar a capacidade fagocítica (Auwerx, 1991). Nesse caso, a capacidade fagocítica é aumentada pela expressão de mais receptores de membrana e aumento da motilidade do citoesqueleto na medida em que essas células se diferenciam (Ravetch e Aderem, 2007).

No caso dos PBMC, células em maior grau de diferenciação, houve menor alteração entre os estímulos por uma ou 48 horas (Figura 11B), quando as células foram tratadas com BAY 41-2272. Entretanto, quando tratados com IFN- $\gamma$  por mais tempo, estas células aumentaram sua atividade fagocítica, uma vez que essa citocina possui vias de ativação relacionadas diretamente com a alteração morfológica de monócitos (Ellis e Beaman, 2004). Todas as contagens de atividade fagocítica foram confirmadas com as imagens de microscopia de contraste de fase (Figura 10). No caso dos neutrófilos, assim como no ensaio de avaliação da produção de ânion superóxido, só foram tratados por 1h, pois sua viabilidade é sensivelmente diminuída em períodos maiores de tratamento, o que reduz consideravelmente a confiabilidade dos resultados (Scheel-Toellner, et al., 2004).

Alterações no espriamento e na atividade fagocítica implicam em mudanças de expressão de moléculas de membrana e alterações morfológicas semelhantes às envolvidas com a migração células. Em experimentos envolvendo migração de neutrófilos induzida por azida, sugere-se que essa migração é mediada via cGMP e proteína-quinases dependentes de cGMP, pois sua migração é reduzida na presença de inibidores de cGMP e de proteína-quinases cGMP-dependentes (VanUffelen, et al., 1998a). Portanto, a sinalização ativada pelo BAY 41-2272, envolvendo o cGMP, está ligada às essas alterações morfológicas necessárias para



migração, fagocitose e espraiamento. Além disso, estudos utilizando Angeli's salt (AS), mostraram aumento dos níveis de cGMP intracelular. O papel do cGMP na migração induzido por AS foi investigado usando um número de inibidores da via de transdução de sinal do cGMP e novamente a migração de neutrófilos foi reduzida por estes inibidores (VanUffelen, et al., 1998b). Estes resultados deixam claro que a ativação de GCs, e subsequente aumento dos níveis de cGMP e ativação das proteína-quinases cGMP-dependente, estão envolvidos nos mecanismos de alteração morfológica e expressão de moléculas de superfície nos neutrófilos.

Bóran e colaboradores (2008) mostraram recentemente que tanto ANP (estimulador de guanilato ciclase solúvel) quanto dibutyryl-cGMP (análogo de cGMP permeável), promovem uma rápida liberação e aumento de tamanho de filamentos em células microgliais. Essas alterações morfológicas envolvem o aumento e redistribuição de f-actina, resultando no aumento da atividade fagocítica. Esses rearranjos de actina e fagocitose de partículas inertes são bloqueados por inibidores de PKG, mostrando o envolvimento dessa via de sinalização. Todas essas vias de sinalização provavelmente estão sendo ativadas com o tratamento com o BAY 41-2272, uma vez que este aumentou significativamente a fagocitose e o espraiamento.

Todas essas funções dos fagócitos (migração, fagocitose e produção de superóxido) são muito importantes para o perfeito funcionamento destas células na defesa do organismo. Nesse plano, o maior problema em defeitos imunológicos relacionados a fagócitos é a falta de resposta protetora frente às infecções. Portanto avaliamos a atividade fagocítica e microbicida das THP-1 e PBMC, quando em contato com um microorganismo íntegro e não somente a componentes deste, como o Zymozan.

Para o nosso estudo foi utilizado o modelo para avaliação da atividade fagocítica/microbicida baseado na co-cultura das células com *E. coli* enteropatogênica (EPEC). Os resultados mostraram que o tratamento com o BAY 41-2272 não aumentou a fagocitose (Figura 12 – tempo de 30 minutos), mas aumentou significativamente o *killing* das EPEC (Figura 12 – demais tempos), opsonizadas ou não. É reconhecido que produtos reativos do oxigênio, como o ânion

superóxido e seus derivados, são altamente tóxicos a bactérias como a *E. coli* (Nauseef, 2007). Esse aumento na atividade microbicida, provavelmente está relacionado à soma dos parâmetros anteriormente descritos, o *burst* oxidativo e a fagocitose. Uma vez que as células apresentam fagocitose aumentada e encontram-se produzindo mais superóxido, o fato de aumentar o *killing* torna-se uma consequência. No entanto, outros parâmetros, como acidificação do pH do fagossomo, transporte de íons e liberação de enzimas lisossomais e de grânulos, não foram avaliados até o presente momento. Portanto, não podemos excluir uma possível participação destes outros fatores. Além disso, também não foi avaliado o aumento da expressão de moléculas de membrana, como receptores de porção Fc de imunoglobulinas e receptores de complemento, que deixam mais eficiente a fagocitose e geram outros sinais que aumentam o *killing*.

Esse resultado é extremamente importante, quando levamos em consideração o tratamento de infecções. São constantes os esforços para desenvolvimento de novas terapias antibióticas, principalmente em pacientes com quadro de imunodeficiências. O desenvolvimento de um processo terapêutico envolvendo a ativação de células fagocíticas traria novas expectativas para esses pacientes. Indivíduos com Doença Granulomatosa Crônica com defeitos de splicing (genes completos, mas não expressos corretamente), ou com Síndrome de Hiper IgM ligada a deficiência de CD40 ou CD40L, poderiam se beneficiar dessa abordagem terapêutica. Principalmente por essas doenças serem tratadas por aplicação de antibióticos como profilaxia ou reposição de imunoglobulinas, mas nada que ative as células de forma efetiva (Geha, et al., 2007; Dinauer, 2005).

Todos esses efeitos podem estar relacionados à produção de citocinas importantes para ativação celular e elevação da resposta. Saber as citocinas produzidas pelo estímulo com o fármaco não só podem elucidar as vias ativadas pelo BAY 41-2272, mas também definir se a ativação observada nas células é fruto direto dos efeitos do fármaco ou secundário à produção de citocinas (Tabela 7).

Não foi observado um aumento na produção de IL-12 pelas células, o que era esperado, pois a IL-12 é uma citocina produzida em altos níveis quando da ativação de monócitos e macrófagos (Murray, et al., 2006). Semelhante ao resultado da

dosagem de IL-12, o IFN- $\gamma$  também não foi produzido em quantidade significativa em relação ao controle, com exceção para os grupos tratados com IFN- $\gamma$  recombinante e BAY 41-2272 com concentração de 1  $\mu$ M. O valor de produção dessa citocina, no grupo que recebeu tratamento com IFN- $\gamma$  recombinante, pode ter sido um falso positivo, uma vez que a citocina exógena pode ter interferido nas medidas de citocinas realmente produzidas. O grupo tratado com 1  $\mu$ M de BAY 41-2272 produziu mais IFN- $\gamma$  que o grupo controle, indicando uma ativação celular importante, pois esta citocina está envolvida na imunomodulação de respostas contra bactérias e outros patógenos, como fungos (Fenton, et al., 1997).

A produção de IFN- $\gamma$  pelas células tratadas com BAY na concentração de 1  $\mu$ M, mas não de 3  $\mu$ M, mostra papéis contraditórios na aplicação do fármaco. São muitos os estudos que mostram a ativação dose-dependente de células por fármacos sintéticos. Em relação ao YC-1, composto com estrutura semelhante a do BAY 41-2272, foi evidenciado a participação de vias diferentes relacionadas à ativação ou inibição de transcrição (Pan, et al., 2005). Essa diferença encontrava-se na dose, utilizada. Numa escala cinética de 0,1 a 30  $\mu$ M, doses até 15  $\mu$ M resultavam em ativação celular. No entanto, doses acima desta ativaram vias de bloqueio de transcrição. O mesmo pode ter acontecido em relação a produção de IFN- $\gamma$ , ou seja, vias de bloqueio de síntese/ativação podem ter sido ativadas em resposta ao excesso de estímulo.

A produção de IFN- $\gamma$  pelos neutrófilos polimorfonucleares após o estímulo com o BAY 41-2272 foi um importante diferencial deste tratamento. Yeaman e colaboradores (1998) mostraram que neutrófilos polimorfonucleares isolados de doadores normais produzem IFN- $\gamma$  em resposta ao estímulo por LPS, IL-12 e TNF- $\alpha$ . Outros estudos com neutrófilos estimulados com IL-12 mostraram a produção de IFN- $\gamma$  por estas células e que esta citocina estava plenamente funcional, resultando na produção de TNF- $\alpha$  pelo próprio neutrófilo e também PBMC (Ethuin, et al., 2004). Esses resultados mostram novas vias de ativação autócrina e parácrina dos neutrófilos, o que poderia ocorrer no estímulo com o BAY 41-2272, ou seja, uma ativação secundária a produção de IFN- $\gamma$  resultante do tratamento. Além disso, estudos com animais evidenciaram a produção desta citocina por neutrófilos polimorfonucleares alveolares no quadro de infecção pulmonar por *Nocardia*

*asteroides* (Ellis e Beaman, 2002). A produção dessa citocina resultante do tratamento aumenta o potencial de uso desse fármaco, uma vez que Gómez e colaboradores (2008) mostraram recentemente que em infecção por *S. pneumoniae* a produção de IFN- $\gamma$  apresenta-se reduzida em camundongos gp91<sup>PHOX<sup>-/-</sup></sup>. O resultado de Gómez e colaboradores caracteriza a dependência da NADPH oxidase para a geração de IFN- $\gamma$  pelos neutrófilos. Fato importante, visto que nosso tratamento induz significativamente a produção de reativos de oxigênio e a expressão gênica da gp91<sup>PHOX<sup>-/-</sup></sup>, o que pode ter gerado a sinalização para liberação de IFN- $\gamma$ .

A produção das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  é intimamente ligada. A geração de uma dessas citocinas implica, geralmente, na liberação da outra. Esse chamado eixo IL-12/IFN- $\gamma$  é muito importante na ativação não só de fagócitos, principalmente os monócitos (Serour, et al., 2007). Envolve a participação de linfócitos T e, *in vivo*, é um dos fatores determinantes na resposta adequada à vários patógenos (Sahiratmadja, et al., 2007). Uma vez que vimos um aumento dignificativo de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é estranho não detectarmos aumento na produção de IL-12. Provavelmente essa produção foi abaixo do nível de sensibilidade do kit para dosagem utilizado. No entanto, novos procedimentos devem ser aplicados para definir a produção ou não dessa citocina.

Houve um aumento na produção de TNF- $\alpha$  em todos os grupos tratados com as duas concentrações de BAY 41-2272. Esse resultado mostra que o fármaco em questão ativa vias de sinalização envolvidas na transdução de sinal, como MAP kinases, induzindo fatores de transcrição como o NF-kB (Igbal e Zaidi, 2008). Essas vias e fatores de transcrição fornecem evidências da seqüência de sinalização que é gerada pela ação do BAY 41-2272. Além disso, os monócitos expressam em suas membranas o receptor de TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ R). Em resposta a essa citocinas, é desse receptor que parte a cascata de sinalização que estimulará o NF-kB e a síntese de várias proteínas envolvidas com a resposta dos fagócitos (Vitale, et al., 2007). Portanto, não se deve descartar a possibilidade dessa citocina, por ação autócrina nos TNF- $\alpha$ R (Deering e Orange, 2006), resultar ou potencializar a ação do fármaco, sendo então muito importante na geração dos resultados que estamos apresentando.

A produção de TNF- $\alpha$  é um fator de ativação de fagócitos muito importante do ponto de vista da resposta à infecções por patógenos. Ghigo e colaboradores (2001) mostraram que a replicação de *C. burnetii* envolve mecanismos de regulação negativa da liberação de TNF- $\alpha$ . Dellacasagrande e colaboradores (2002) estudando o mesmo parasita evidenciaram uma nova via microbicida induzida pela sinalização por IFN- $\gamma$ . Esse mecanismo compreende a aderência via integrina CD54/ $\beta_2$  juntamente com o TNF de membrana à células infectadas por *C. burnetii*, e a eliminação destas através da apoptose dependente de contato entre as células). Outros estudos mostram a resistência da infecção por *Toxoplasma* através do bloqueio da mobilização do TNF- $\alpha$  para a superfície dos neutrófilos, revelando um novo mecanismo imunossupressor desse parasita (Bennouna, et al., 2006). Esses mecanismos caracterizam a importância dessa citocina na defesa do organismo contra infecções. A produção de TNF- $\alpha$  após estímulo com o BAY 41-2272 é aumentada significativamente o potencial desse fármaco no uso em relação às infecções, principalmente em alguns casos de imunodeficiência.

Todos esses efeitos celulares resultantes da aplicação do fármaco dependem, de forma aguda, das proteínas já disponíveis nas células, como no caso da produção de ânion superóxido. No entanto, em tratamentos prolongados (ensaios de 48 horas) outros fatores são ativados e/ou produzidos, como o caso das citocinas e as próprias proteínas do complexo NADPH oxidase. Uma vez que o BAY 41-2272 ativa vias importantes de sinalização (Guanilato ciclase solúvel/cGMP e Adenilato ciclase/cAMP), estudamos suas implicações sobre a expressão de genes importantes dentro do funcionamento dos fagócitos. Para tanto avaliamos a expressão gênica do *CYBB*, gene codificador da gp91<sup>phox</sup> (Figura 13), o principal gene do sistema NADPH oxidase, visto que defeitos na sua expressão são responsáveis por cerca de 70% dos casos de Doença Granulomatosa Crônica (Leuseun, et al., 1998).

O tratamento com o fármaco aumentou significativamente a expressão do gene codificador da gp91<sup>phox</sup> em PBMC e THP-1, mas não em neutrófilos (Figura 13). Esse aumento demonstra a indução da expressão gênica do sistema responsável pela geração de reativos de oxigênio, portanto o fármaco atua não só nas proteínas da NADPH oxidase já disponíveis, mas também na geração destas. O fato dos

neutrófilos não responderem ao tratamento com o BAY pode estar relacionado a ativação de outras vias, que não as que estão envolvidas no aumento da expressão gênica. No entanto, o fato da célula ter sido tratada apenas por uma hora é um diferencial muito grande, uma vez que a maior parte de respostas significativas relativas à expressão gênica ocorrem com mais de 12 horas (Lopes, et al., 1999). Além do pouco tempo de tratamento há o baixo rendimento de RNA obtido dessas células, uma vez que estão em um nível de diferenciação muito avançado. Os neutrófilos também possuem diversas nucleases que podem degradar facilmente o RNA, resultando num rendimento ainda menor de material (Gottlieb, et al., 1995). Todos esses aspectos podem ter corroborado para a baixa expressão gênica nessas células.

O aumento na expressão do gene *CYBB* nos PBMC tratados com IFN- $\gamma$  são semelhantes aos resultados de Newburger e colaboradores (1991), que mostraram um aumento de até 12 vezes na expressão desse gene após incubação por 24 horas dos PBMC com a citocina em questão. Da mesma forma essa citocina aumentou a expressão do gene *CYBB* em THP-1 como já demonstrado por Condino-Neto e colaboradores (1998). Todos esses dados reforçam os resultados relativos ao tratamento com o BAY 41-2272.

Em relação às diferenças entre a expressão dos diferentes tipos celulares estudados, podemos observar que o aumento ocorreu de acordo com o estado de maturação do fagócito mononuclear, alcançando o estágio mais elevado na fase de monócito. Outros grupos já demonstraram esse aumento de expressão da gp91<sup>phox</sup> de acordo com o grau de diferenciação celular, associando o nível aumentado de expressão gênica a apresentação de marcadores associados a propriedades citotóxicas, como o CD16 e CD23 (Rouzaut, et al., 2000).

Esse aumento na expressão do gene *CYBB* nos PBMC e THP-1 pode ser resultado da ativação de vários fatores de transcrição. Esse gene possui o melhor detalhamento sobre a regulação transcricional dentre os genes da NADPH oxidase (Lievens, et al., 1995). Análises estruturais de aproximadamente 1,5kb da região 5'-UTR do gene *CYBB* revelaram a presença de motivos CCAAT box duplicados entre -106 e -124nt (numerados crescentemente a partir do início do sítio de transcrição),

assim como um motivo TATA box não-consensual em torno de -30nt (Skalnik, et al., 1991).

Estes estudos envolvendo as análises de regiões promotoras elucidam os mecanismos de regulação transcricional dos genes do sistema NADPH oxidase. Foram propostos alguns mecanismos repressores e ativadores da região promotora do gene *CYBB*. Este gene possui elementos *cis*, positivos e negativos, que interagem com múltiplos fatores de transcrição, tais como: STAB1, CDP (Eklund, et al., 2000; Hawkins, et al., 2001) e Pbx1, expressos constitutivamente em células indiferenciadas ou em períodos precoces de diferenciação, como as THP-1 (Eklund, et al., 2000; Neufeld, et al., 1992). Recentemente Luengo e colaboradores (2008) mostraram que a ligação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B ao gene *CYBB*, assim como para o *NCF1*, é necessária para sua expressão e a atividade da NADPH oxidase. Sendo que houve uma marcante produção de TNF- $\alpha$ , sabidamente dependente de NF- $\kappa$ B para sua expressão (Ci, et al., 2008), podemos sugerir que o BAY 41-2272 estaria ativando vias de sinalização envolvidas com a ativação deste fator de transcrição.

Além do NF- $\kappa$ B, foi descrito um elemento *cis* no *CYBB* necessário para a expressão de gp91<sup>phox</sup> induzida por IFN- $\gamma$ , referida como sítio de ligação para o fator de transcrição HAF1. *In vivo*, mutações nos sítios de ligação do HAF-1 resultaram em quadro característico da Doença Granulomatosa Crônica (Newburger, et al., 1994; Suzuki, et al., 1998). O aumento da expressão gênica após o tratamento com IFN- $\gamma$  já era esperado, uma vez que este induz a transcrição do *NCF2* e *CYBB* durante a diferenciação de precursores mielóides para monócitos e também de monócitos maduros para macrófagos (Eklund, et al., 1998). Um ano depois este mesmo grupo identificou o recrutamento do fator de transcrição CBP (CREB-binding protein) para um grupo de fatores de transcrição envolvidos na expressão gênica de componentes do sistema NADPH oxidase. Essa interação, composta por PU.1 / IRF1 / ICSBP / CBP, mostrou um novo mecanismo para a ativação dos genes da gp91<sup>phox</sup> (Eklund e Kakar, 1999).

Muitas dessas vias de sinalização e transcrição são reconhecidamente dependentes de cGMP e cAMP, gerados pelo tratamento com o BAY 41-2272

(Oliveira-Junior, et al., 2007). Podemos citar uma série de fatores de transcrição, ligados à via de sinalização dependente de cAMP e cGMP, que estão envolvidos com alterações nos fagócitos. Dentre estes o CREB-1 (Cyclic AMP response element binding protein-1) possui o maior potencial de participação nessa via iniciada pelo BAY 41-2272. O CREB-1 liga-se ao CRE, um sítio localizado no DNA (geralmente regiões promotoras), podendo se ligar ao ATF-1 e elemento modulador responsável pelo AMPc, e também a membros da família AP-1, como c-Jun (Montminy, et al., 1986; Hai e Curran, 1991). Múltiplas vias de sinalização envolvendo cAMP ou cGMP, incluindo proteínas kinases A e G, AMPc-responsiva, proteína kinase C, CaM kinases II e IV dependentes de cálcio/calmodulina, e uma kinase RSK2 Ras dependente de serina/tirosina, medeiam a fosforilação e ativação de CREB-1 em diferentes tipos celulares (Hagiwara, 1996; Muthusamy e Leiden, 1998; Barlow, et al., 2008). Por outro lado, CREB-1 é descrito muitas vezes com papel de regulador negativo de alguns genes, como no estudo com macrófagos inibindo expressão de Akt e proliferação celular (Chen, et al., 2006).

Apesar de todas as especulações sobre o mecanismo pelo qual o BAY 41-2272 age, esse ainda permanece obscuro. Estudos para entender melhor a via pela qual este fármaco age, em nível citoplasmático e nuclear, ainda são necessários para um melhor entendimento não só do seu efeito, mas também do funcionamento dos fagócitos. Estes estudos contribuiriam na exploração do potencial do BAY 41-2272 para o desenvolvimento de novas terapias destinadas ao controle das infecções, principalmente no âmbito das imunodeficiências.





JORGE CHAM © 2008

WWW.PHDCOMICS.COM

## 6 CONCLUSÃO

A compreensão do funcionamento do sistema NADPH oxidase, sua regulação e defeitos genético-moleculares, além do estudo de mecanismos farmacológicos envolvidos na ativação celular dos fagócitos podem contribuir para o surgimento de estratégias adequadas para o controle de imunodeficiências, como Doença Granulomatosa Crônica.

Em conjunto, este trabalho demonstra até o momento que o BAY 41-2272 ativou intensamente células THP-1, PBMC e PMN humanos, com destaque para as seguintes funções:

- Aumento da liberação de ânion superóxido;
- Aumento da fagocitose e atividade microbicida;
- Aumento da produção de TNF- $\alpha$ ;
- Aumento da expressão do gene *CYBB* (gp91<sup>phox</sup>) em células THP-1 e PBMC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

Abe Y, Sekiya S, Yamasita T, Sendo F. Vascular hyperpermeability induced by tumor necrosis factor and its augmentation by IL-1 and IFN-gamma is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. *J Immunol.* 1990;145(9):2902-2907.

Adler A, Messina E, Sherman B, Wang Z, Huang H, Linke A, Hintze TH. NAD(P)H oxidase-generated superoxide anion accounts for reduced control of myocardial O<sub>2</sub> consumption by NO in old Fischer 344 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H1015-22.

Aggelidou E, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Up-regulation of nitric oxide synthase and modulation of the guanylate cyclase activity by corticotropin-releasing hormone but not urocortin II or urocortin III in cultured human pregnant myometrial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:3300-3305.

Ahlin A, Larfars 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; 6:420-424.

Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, Nobles M, Segal AW. The large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel is essential for innate immunity. *Nature.* 2004; 427:853-858.

Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med.* 2007; 261(6): 511-28.

Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis.* 1985; 152:668-89.

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

Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia.* 1991; 44:22-31.

Azzawi M, Hasleton P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. *Cardiovasc Res.* 1999; 43:850-859.

Azzawi M, Hasleton PS, Hutchinson IV. TNF-alpha in acute cardiac transplant rejection. *Cytokines Cell Mol Ther.* 1999; 5: 41-9.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. c2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Babior BM. NADPH Oxidase: an update. *Blood*. 1999; 93:1464-1476.

Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM, Price TH, Rosen H, Taylor RF, et al. Absence of monoclonal-antibody-defined protein complex in boy with abnormal leucocyte function. *Lancet*. 1984; 1(8376):535-537.

Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleib U, et al. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *Pharmacology*. 2001; 1:1-13.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271:C1424-37.

Bellinati-Pires R, Salgado MM, Joazeiro PP, Carneiro-Sampaio MMS. Delayed phagocytosis and bacterial killing in Chediak-Higashi syndrome neutrophils detected by a fluorochrome assay. Ultrastructural aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87:575-81.

Bennouna S, Sukhumavasi W, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* inhibits toll-like receptor 4 ligand-induced mobilization of intracellular tumor necrosis factor alpha to the surface of mouse peritoneal neutrophils. *Infect Immun*. 2006; 74:4274-81.

Bogdan C. Macrophages, encyclopedia of life sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons Press; 2006.

Bokoch GM. Chemoattractant signalling and leukocyte activation. *Blood*. 1995; 86:1649-1660.

Bóran MS, Baltrons MA, Garcia A. The ANP-cGMP-protein kinase G pathway induces a phagocytic phenotype but decreases inflammatory gene expression in microglial cells. *GLIA*. 2008; 56:394-411.

Brioni JD, Nakane M, Hsieh GC, Moreland RB, Kolasa T, Sullivan JP. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2002; 14:8-14.

Buechler WA, Nakane M, Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 174:351-357.

Bulet P, Hetru C, Dimarq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Develop Comp Immunol*. 1999; 23:329-344.

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

Cassatella MA, Della-Bianca V, Berton G, Rossi F. Activation by gamma interferon of human macrophage capability to produce toxic oxygen molecules is accompanied by decreased Km of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 132:908-14.

Chakravorty D, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Mu MM, Yoshida T, Yokochi T. Inhibition of caspase 3 abrogates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by preventing activation of NF-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Infect Immun.* 2001; 69: 1315-21.

Chan JY, Wang SH, Chan SH. Differential roles of iNOS and nNOS at rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *Shock.* 2001; 15:65-72.

Chen HC, Byrd JC, Muthusamy N. Differential role for cyclic AMP response element binding protein-1 in multiple stages of B cell development, differentiation, and survival. *J Immunol.* 2006; 176:2208-2218.

Ci X, Song Y, Zeng F, Zhang X, Li H, Wang X, Cui J, Deng X. Ceftiofur impairs pro-inflammatory cytokine secretion through the inhibition of the activation of NF-kappaB and MAPK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372:73-7.

Condino-Neto A, Muscará MN, Grumch AS, Carneiro-Sampaio MM, De Nucci G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol.* 1993; 35(5):485-90.

Codino-Neto A. Liberação de óxido nítrico por neutrófilos e células mononucleares de pacientes com doença granulomatosa crônica: efeito da terapia com interferon gama humano recombinante [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1994.

Condino-Neto A, Muscara MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandao A C, 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; 16:357-364.

Condino-Neto A, Whitney C, Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. *J Immunol.* 1998; 161:4960-4967.

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; 278:26480-26487.

Crossa AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1657:1-22.

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

Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnauld P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cellcultures. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(12):1600-1603.

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 USA.* 2001; 98:3001–3005.

De Mendez I, Homayounpour N, Leto TL. Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol.* 1997; 17:2177-2185.

Deering RP, Orange J. Development a clinical assay to evaluate toll-like receptor function. *Clin Vacin Immunol.* 2006; 13: 68-76.

Deleo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura N, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest.* 1998; 101:455-463.

Dellacasagrande J, Ghigo E, Raoult D, Capo C, Mege JL. IFN- $\gamma$ -induced apoptosis and microbicidal activity in monocytes harboring the intracellular bacteria *Coxiella burnetii* require membrane TNF and homotypic cell adherence. *J Immunol.* 2002; 169:6309-15.

Dinarelo CA. Interleukin-1 and interleukin antagonist. *Blood.* 1991; 77:1627-52.

Dinauer MC. Chronic Granulomatous Disease and other disorders of phagocyte function. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:89-95.

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

Dong F, Gutkind JS, Lerner AC. Granulocyte colony-stimulating factor induces ERK5 activation, which is differentially regulated by protein-tyrosine kinases and protein kinase C: regulation of cell proliferation and survival. *J Biol Chem.* 2001; 276:108-111.

Dorman SE, Holland SM. Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000; 11:21-33.

Dri P, Haas E, Cramer R, Menegazzi R, Gasparini C, Martinelli R, Scheuric P, Patriarca P. Role of the 75-kDa TNF receptor in TNF-induced activation of neutrophil respiratory burst. *J Immunol.* 1999; 162:460-6.

El Bekay R, Alvarez M, Monteseirin J, Alba G, Chacon P, Vega A, et al. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Blood.* 2003; 102:662-671.

El Benna J, Dang PM, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J, et al. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem.* 1997; 272:17204-1728.

El Benna J, Ruedi JM, Babior BM. Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac 2 operates *in vivo* as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac 2 and the cytosolic oxidase components p47(phox) and p67 (phox) to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J Biol Chem.* 1994; 269:6729-6734.

El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocicado MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp.* 2005; 53:199-206

Ellis TN, Beaman BL. Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon- $\gamma$  in response to pulmonary infection with *Nocardia asteroides*. *J Leukoc Biol.* 2002; 72:373-381.

Ellis TN, Beaman BL. Interferon- $\gamma$  activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology.* 2004; 112:2-12.

Enane NA, Frenkel K, O'Connor JM, Squibb KS, Zelikoff JT. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology.* 1993; 80:68-72.

Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, Ezekowitz RA. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1996; 8:29-35.

Ethuin F, Gerard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidal MA, Jacob L, Chollet-Martin S. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin 12. *Lab Invest.* 2004; 84:1363-1371.

Ezekowitz RAB, Hoffman J. Innate Immunity. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10:9-53.

Farries TC, Atkinson JP. Evolution of the complement system. *Immunol Today.* 1991; 12:295-300.

Faust LR, El Benna J, Babior BM, Chanock SJ. The phosphorylation targets of p47phox a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest.* 1995; 96:1499-1505.

Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 1996; 272:50-3.

Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM, Kornfeld H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1997; 65:5149-5156.

Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol.* 1998; 10:363-72.

Fukumoto H, Tamura T, Kamiya Y, Usuda J, Suzuki T, Kanzawa F, et al. Activation-induced apoptosis of peripheral lymphocytes treated with 7-hydroxystaurosporine, UCN-01. *Invest New Drugs.* 1999; 17:335-341.

Gabig TG, Crean CD, Mantel PL, Rosli R. Function of Wild-Type or Mutant Rac2 and Rapla GTPases in Differentiated HL60 Cell NADPH Oxidase Activation. *Blood.* 1995; 85(3):804-811.

Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* 1995; 48:184-188.

Geha, R.S., Notarangelo, L.D., Casanova, J.L., Chapel, H., Conley, M.E., Fischer, A., et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allerg Clin Immunol.* 2007; 120(4):776-94.

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

Ghigo E, Capo C, Raoult D, Mege JL. Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: role in microbicidal defect of Q fever. *Infect Immun.* 2001 Apr;69(4):2345-52.

Gottlieb RA, Giesing HA, Engler RL, Babior BM. The acid deoxyribonuclease of neutrophils: a possible participant in apoptosis-associated genome destruction. *Blood.* 1995; 86(6):2414-8.

Gombart AF, Koeffler HP. Neutrophil specific granule deficiency and mutations in the gene encoding transcription factor C/EBP (epsilon). *Curr Opin Hematol.* 2002; 9(1):36-42.

Gomez JC, Yamada M, Rebert NA, Doerschuk CM. IFN- $\gamma$  production by neutrophils during *S. pneumoniae* pneumonia requires NADPH oxidase. *FASEB J.* 2008; 22:47.10.

Görlach A, Lee PL, Roesler J, Hopkins PJ, Christensen B, Green ED, et al. A p47phox pseudogene carries the most common mutation causing p47phox-deficient chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 1997; 100:1907-1918.

Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:3720-3704.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31:1454.



Hammond B, Hess ML. The oxygen free radical system: potential mediator of myocardial injury. *J Am Coll Cardiol.* 1985; 6(1):215-20.

Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, Bohme E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.* 1990; 272:221-3.

Hellewell PG, Williams TJ. *The Neutrophil. Em: Immunopharmacology of Neutrophils.* New York: Academic Press; 1994. p. 1-4.

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15: 578-584.

Hibbs-Jr JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;157:87-94.

Hibbs-r JB, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for the expression of the activated metabolic in target cells. *J Immunol.* 1987; 138:550-65.

Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, Macmicking JD, Nathan C, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *Faseb J.* 1997; 11:955-64.

Hiemstra PS, Eisenhauer PB, Harwig SS, Van Den Barselaar MT, Van Furth R, Lehrer RI. Antimicrobial proteins of murine macrophages. *Infect Immun.* 1993; 61(7):3038-46.

Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18:484-491.

Hu TH, Bei L, Qian ZM, Shen X. Intracellular free calcium regulates the onset of the respiratory burst of human neutrophils activated by phorbol myristate acetate. *Cell Signal.* 1999; 11(5):355-60.

Igbal J, Zaidi M. TNF-induced MAP kinase activation oscillates in time. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 371:906-11.

Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS. Activation of purified soluble guanylate cyclase by arachidonic acid requires absence of enzyme-bound heme. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 928(2):160-70.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology.* New York: Garland Science Press; 2001.

Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989; 54:1-13.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.

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

Kapus A, Romanek R, Qu AY, Rotstein OD, Grinstein S. A pH-sensitive and voltage-dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages. *J Gen Physiol.* 1993; 102:729-760.

Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler H, Pircher H, et al. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity.* 2000; 13: 549-60.

Kenney RT, Malech HL, Epstein ND, Roberts RL, Leto TL. Characterization of the p67phox gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood.* 1993; 82:3739-3744.

Kern S, Robertson SA, Mau VJ, Maddocks S. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol Reprod.* 1995; 53:1407-1416.

Khare S, Tien XY, Wilson D, Wali RK, Bissonnette BM, Scaglione S, et al. The role of protein kinase-C alpha in the activation of particulate guanylate cyclase by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in CaCo-2 cells. *Endocrinology.* 1994; 135:277-283.

Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood.* 1994; 84:4226-33.

Koesling D, Bohme E, Schultz G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *Faseb J.* 1991; 5:2785-91.

Koglin M, Stasch JP, Behrends S. BAY 41-2272 Activates Two Isoforms of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. *Bioch Biophys Res Comm.* 2002; 292:1057-1062.

Kolb SA, Lahrtz F, Paul R, Leppert D, Nadal D, Pfister HW, Fontana A. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: upregulation of MMP-9 and TIMP-1 in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol.* 1998; 84:143-50.

Kristof AS, Marks-Konczalik J, Moss J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. *J Biol Chem.* 2001; 276:8445-8452.

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

Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res.* 2003; 93:700-709

Kuribayashi F, Nuno H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* 2002; 21:6312-6320.

- Lachman PJ, Hughes-Jones NC. Initiation of complement activation. *Springer Semin Immunopathol.* 1984; 7:143-162.
- Lee FD. The role of interleukin-6 in development. *Dev Biol.* 1992; 151:331-338
- Lee YR, Shim HJ, Yu HN, Song EK, Park J, Kwon KB, et al. Dimethylsulfoxide induces upregulation of tumor suppressor protein PTEN through nuclear factor- $\kappa$ B activation in HL-60 cells. *Leuk Res.* 2005; 29:401-405.
- Lehrer R I, Ganz T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood.* 1990; 76:2169-81.
- Leher R, Ganz T, Selsted ME, Barbior BM, Curnutte JT. Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med.* 1988; 109:127-42.
- Lopes LR, Hoyal CR, Knaus UG, Barbior BM. Activation of a leukocyte NADPH oxidase by protein kinase C in a partially recombinant cell-free system. *J Biol Chem.* 1999; 274: 15533-15537.
- Lord PCW, Wilmont LMG, Mizel SB, McCall CE. Expression of interleukin-1 alfa and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest.* 1991; 87:1312-21.
- Malech HL, Nauseef WM. Primary inherited defects in neutrophil function: etiology and treatment. *Semin Hematol.* 1997; 34:279-90.
- Mansouri D, Adimi P, Mirsaedi M, Mansouri N, Khalilzadeh S, Masjedi MR, et al. Inherited disorders of the IL-12-IFN-gamma axis in patients with disseminated BCG infection. *Eur J Pediatr.* 2005; 164(12):753-757.
- Marciano BE, Wesley R, De Carlos ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, et al. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(5): 692-699.
- Martin E, Lee YC, Murad F. YC-1 activation of human soluble guanylyl cyclase has both heme-dependent and heme-independent components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:12938-42.
- Mcknight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, Wolf SF, Abbas AK. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J Immunol.* 1994; 152:2172-9.
- Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9:4-9.
- Mellman I, Turley SJ, Steinman RM. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:231-237.
- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83:6682-6.

Morgan BP. Complement: Clinical aspects and relevance to disease. London: Academic Press; 1990.

Moriwaki K, Kiyomoto H, Hitomi H, Ihara G, Kaifu K, Matsubara K, et al. Interferon-gamma enhances superoxide production in human mesangial cells via the Jak-STAT pathway. *Kidney Int.* 2006; 70(4):788-93.

Morris SM, Billiar TR. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1994; 266:E829-39.

Morrisette N, Gold E, Aderem A. The macrophage--a cell for all seasons. *Trends Cell Biol.* 1999; 9:199-201.

Mullershausen F, Russwurm M, Friebe A, Koesling D. Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272. *Circulation.* 2004; 109(14):1711-3.

Murray HW. Cytokines as antimicrobial therapy for the T cell-deficient patient: prospects for treatment of nonviral opportunistic infections. *Clin Infect Dis.* 1993; 17 Suppl 2:S407-13.

Murray HW, Hariprasad J, Agüero B, Arakawa T, Yeganegi H. Antimicrobial response of a T cell-deficient host to cytokine therapy: effect of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis in nude mice. *J Infect Dis.* 1995; 171:1309-16.

Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X. Responses to *Leishmania donovani* in Mice Deficient in Interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. *Infect Immun.* 2006; 74:4370-4374.

Nagasaki A, Gotoh T, Takeya M, Yu Y, Takiguchi M, Matsuzaki, et al. Coinduction of nitric oxide synthase, argininosuccinate synthetase, and argininosuccinate lyase in lipopolysaccharide-treated rats. RNA blot, immunoblot, and immunohistochemical analyses. *J Biol Chem.* 1996; 271:2658-62.

Naito M. Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int.* 2008; 58(3):143-55.

Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* 2007; 219:88-102.

Newburger PE, Dai Q, Whitney C. In vitro regulation of human phagocyte cytochrome b heavy and light chain gene expression by bacterial lipopolysaccharide and recombinant human cytokines. *J Biol Chem.* 1991; 266:16171-7.

Newburger PE, Ezekowitz RA. Cellular and molecular effects of recombinant interferon gamma in chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1988; 2:267-276.

Newburger PE, Ezekowitz RA, Whitney C, Wright J, Orkin SH. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon  $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci*. 1988; 85:5215-5219.

Newburger PE, Luscinskas FW, Ryan T, Beard CJ, Wright J, Platt OS, et al. Variant chronic granulomatous disease: modulation of the neutrophil defect by severe infection. *Blood*. 1986; 68:914-9.

Niedbala W, Wei XQ, Campbell C, Thomson D, Komai-Koma M, Liew FY. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:16186-91.

Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem*. 1999; 274:22999-3005.

Nussler AK, Liu ZZ, Di Silvio M, Sweetland MA, Geller DA, Lancaster JR, et al. Hepatocyte inducible nitric oxide synthesis is influenced in vitro by cell density. *Am J Physiol*. 1994; 267:C394-401.

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; 218:187-98.

Oliveira-Junior EB, Thomazzi SM, Rehder J, Antunes E, Codino-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; 567(1-2):43-9.

Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 153(3):1251-6.

Pan SL, Guh JH, Peng CY, Chang YL, Cheng FC, Chang JH, et al. A potential role of YC-1 on the inhibition of cytokine release in peripheral blood mononuclear leukocytes and endotoxemic mouse models. *Thromb Haemost*. 2005; 93: 940-948.

Park JW, El Benna J, Scott KE, Christensen BL, Chanock S, Babior BM. Isolation of a complex of respiratory burst oxidase components from resting neutrophil cytosol. *Biochemistry*. 1994; 33:2907-2911.

Prando CCM. O papel crucial do eixo il12/23-ifny para o desenvolvimento e ativação do sistema nadph oxidase humano [Tese]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 2008.

Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J Biol Chem*. 1993; 268:20983-20987.

Rabinovitch M, Destefano MJ. Macrophage spreading *in vitro*: Inducers of spreading. *Exp Cell Res*. 1973; 77:323-34.

Rada BK, Geiszt M, Káldi K, Timár C, Ligeti E. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood*. 2004; 104:2947-2953.

Rae J, Newburger PE, Dinauer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, Curnutte JT. X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *Am J Hum Genet*. 1998; 62:1320-31.

Rae J, Noack D, Heyworth PG, Ellis BA, Curnutte JT, Cross AR. Molecular analysis of 9 new families with chronic granulomatous disease caused by mutations in CYBA, the gene encoding p22phox. *Blood*. 2000; 96:1106-1112.

Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. 1983; 306:174-176.

Ravetch JV. IgG Fc Receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:275-290.

Ravetch J, Aderem A. Phagocytic cells. *Immunol Rev*. 2007; 219:5-7.

Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*. 2002; 416:291-297.

Roman V, Dugas N, Abadie A, Amirand C, Zhao H, Dugas B, Kolb JP. Characterization of a constitutive type III nitric oxide synthase in human U937 monocytic cells: stimulation by soluble CD23. *Immunology*. 1997; 91:643-648.

Roos D, De Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1996; 87:1663-1681.

Rosenzweig SD, Holland SM. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(4):620-626.

Rossi AG, Mccutcheon JC, Roy N, Chilvers ER, Haslett C, Dransfield I. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP. *J Immunol*. 1998; 160:3562-3568.

Rottman M, Soudais C, Vogt G, Renia L, Emile JF, Decaluwe H, et al. IFN-gamma mediates the rejection of haematopoietic stem cells in IFN-gammaR1-deficient hosts. *PLoS Med*. 2008; 5(1):e26.

Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, DC: ASM Press; 1994.

Sahiratmadja E, Baak-Pablo R, De Visser AW, Alisjahbana B, Adnan I, Van Crevel R, et al. Association of polymorphisms in IL-12/IFN-gamma pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia. *Tuberculosis*. 2007; 87:303-11.

Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, Webb PR, McGettrick HM, Assi LK, et al. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood*. 2004; 104(8):2557-2564.

Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem*. 1992; 267:5317-23.

Serour F, Mizrahi A, Somekh E, Feinberg J, Picard C, Casanova JL, Dalal I. Analysis of the interleukin-12/interferon-gamma pathway in children with non-tuberculous mycobacterial cervical lymphadenitis. *Eur J Pediatr*. 2007;166(8):835-41.

Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, Mclaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol*. 2005; 78(5):1025-42.

Skorokhod OA, Schwarzer E, Ceretto M, Arese P. Malarial pigment haemozoin, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1 beta and LPS do not stimulate expression of inducible nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human-purified human monocytes. *Malar J*. 2007; 6:73-81.

Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*. 1992; May:28-35.

Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hubner F, Liao JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol*. 1998; 63:732-739.

Stasch JP, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Minuth T, et al. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol*. 2002; 135:333-343.

Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*. 2001; 410:212-5.

Stites DP, Terr AL, Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*. 1994; 33:5636-5640.

Takemura H, Kaku M, Kohno S, Hirakata Y, Tanaka H, Yoshida R, et al. Evaluation of susceptibility of gram-positive and -negative bacteria to human defensins by using radial diffusion assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40(10):2280-4.

Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev*. 1993; 73(4):797-821.

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; 72:1349-1357.

Traylor TG, Sharma VS. Why NO? *Biochemistry.* 1992; 31:2847-9.

Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T. A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 199:1378-1387.

Ueyama T, Tatsuno T, Kawasaki T, Tsujibe S, Shirai Y, Sumimoto H, et al. A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and p47phox. *Mol Biol Cell.* 2007; 18:441-454.

Unanue ER. Biochemistry and biology of antigen presentation by macrophages. *Cell Immunol.* 1986; 99:3-6.

VanUffelen BE, de Koster BM, Elferink JG. Interaction of cyclic GMP and cyclic AMP during neutrophil migration: involvement of phosphodiesterase type III. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56(8):1061-1063.

Vanuffelen BE, Van Der Zee J, De Koster BM, Vansteveninck J, Elferink JG. Sodium azide enhances neutrophil migration and exocytosis: involvement of nitric oxide, cyclic GMP and calcium. *Life Sci.* 1998; 63:645-657.

Vitale RF, Ribeiro FAQ. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007; 73.

Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev.* 1987; 39:163-196.

Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Bohme E, et al. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:2592-6.

Weiss J, Victor M, Stendahl O, Elsbach P. Respiratory burst facilitates the digestion of *Escherichia coli* killed by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1982; 55:2142-2147.

Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology.* 2004; 111: 41-52.

Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, et al. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood.* 2000; 96:1646-1654.



Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000; 80:617-53.

Woodman RC, Ruedi J, Jesaitis AJ, Okamura N, Quinn MT, Smith RM, et al. Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1991; 87:1345-1351.

Wu CC, Ko FN, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol.* 1995; 116:1973-8.

Yamamoto A, Taniuchi S, Tsuji S, Hasui M, Kobayashi Y. Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*. *Clin Exp Immunol.* 2002; 129(3):479-84.

Yamasaki K, Gallo RL. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol.* 2008; 18(1):11-21.

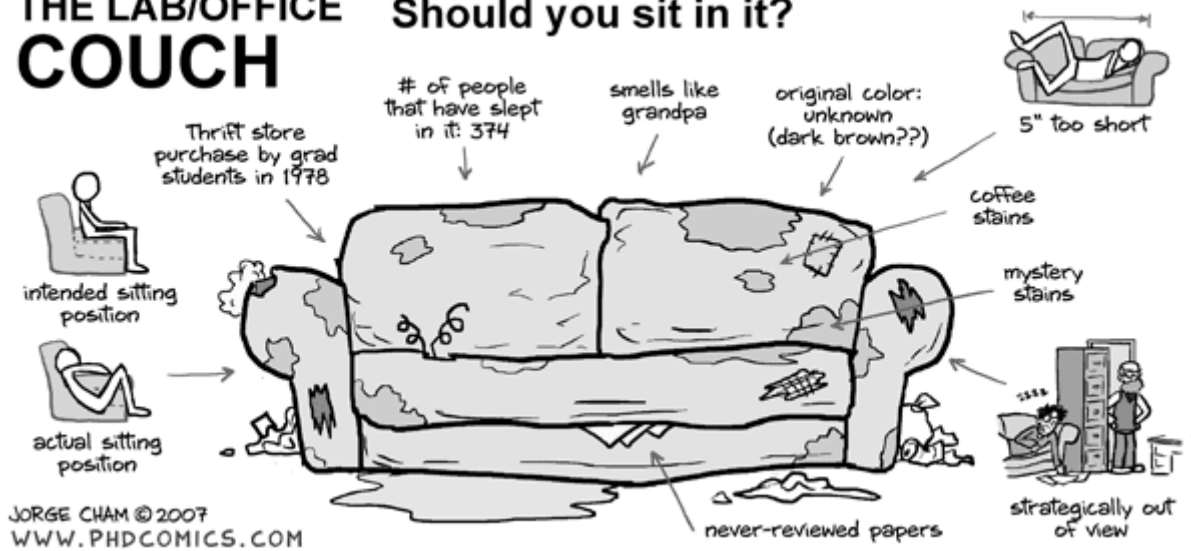
Yeaman GR, Collins JE, Currie JK, Gurye PM, Wira CR, Fanger MW. IFN- $\gamma$  produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol.* 1998; 160:5145-5153.

Zelezetsky I, Pag U, Antcheva N, Sahl HG, Tossi A. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 434(2):358-64.

Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate Immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* 2000; 173:39-51.

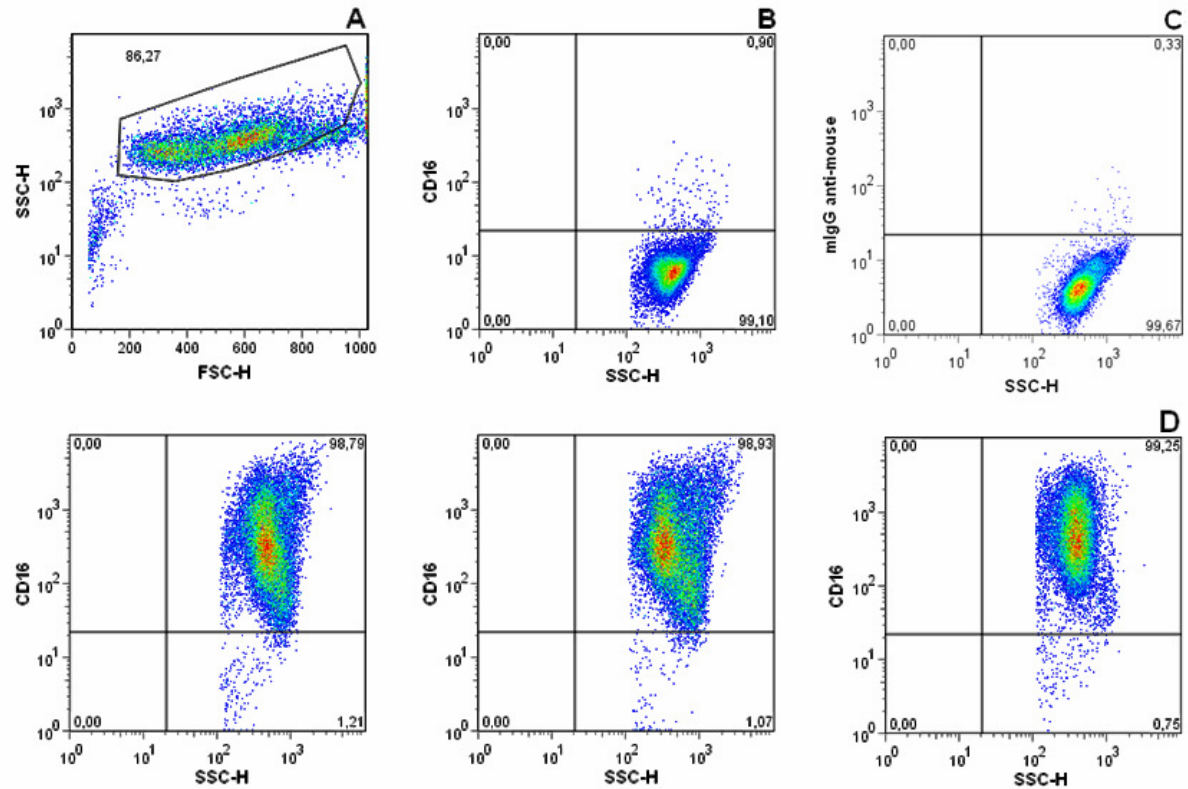
# THE LAB/OFFICE COUCH

## Should you sit in it?



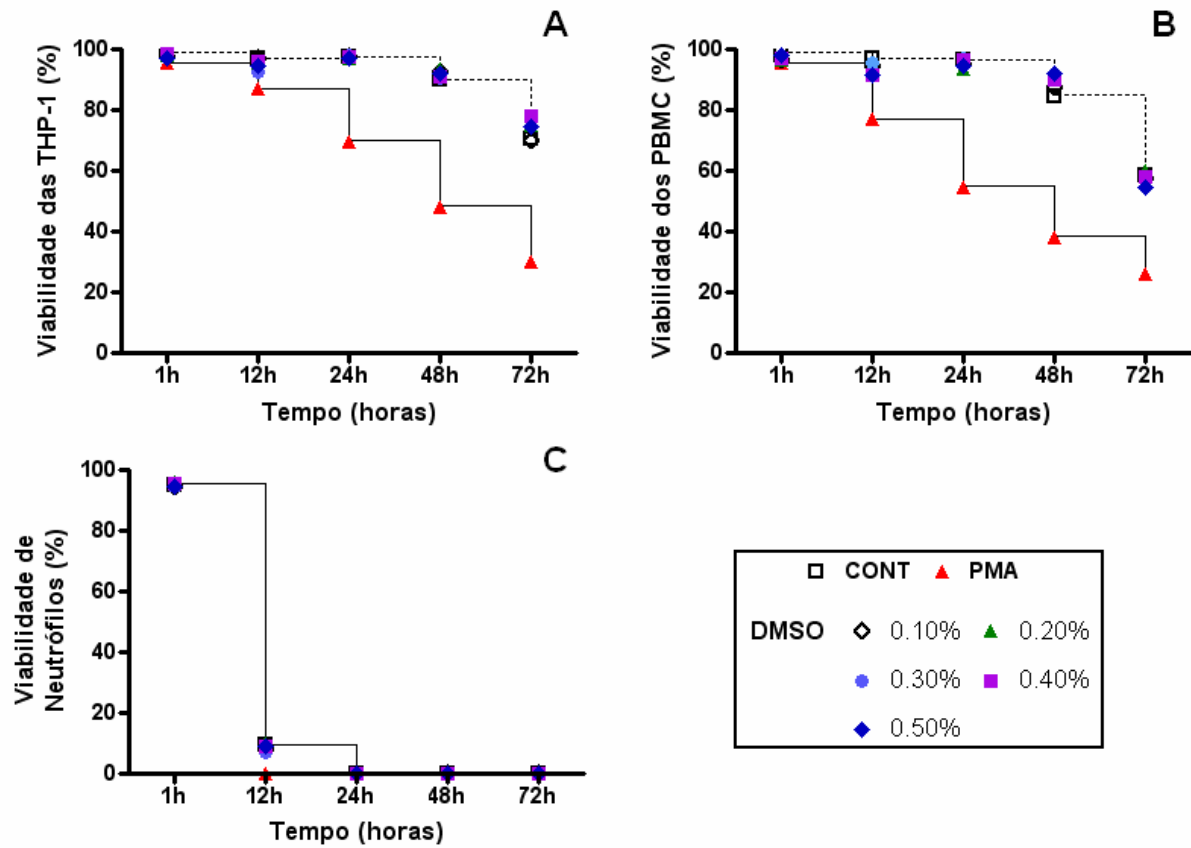
# ANEXOS

## ANEXO A – FENOTIPAGEM DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES



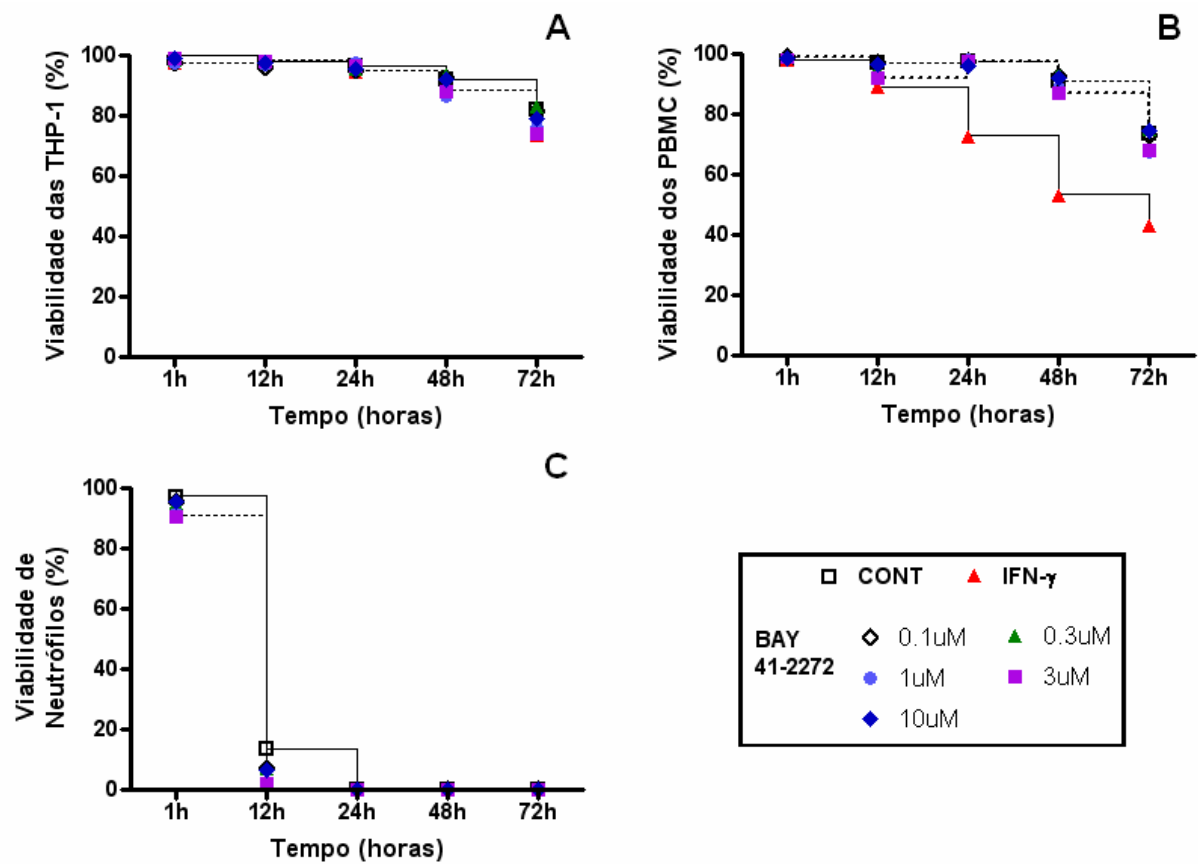
**Expressão de CD16 em células polimorfonucleares de sangue periférico.** Após a separação celular as células foram ajustadas para uma concentração de  $1 \times 10^6$ /mL e marcadas com anticorpo anti-CD16-FITC para análise por citometria de fluxo. (A) Aquisição da população de células G1→R1. (B) Controle de células não marcadas. (C) Marcação com anticorpos não específicos para humanos (mIgG2a anti-mouse) como controle isotípico. (D) Três experimentos evidenciando a marcação das células pela expressão do CD16 e granulosidade, mostrando o número de células CD16<sup>+</sup> acima de 98%.

## ANEXO B – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTOS



**DMSO não possui efeito citotóxico sobre células THP-1, PBMC e PMN.** Análise da viabilidade das células THP-1 (A), PBMC (B) e PMN (C), tratadas por 1h, 12h, 24h, 48h ou 72h com DMSO (0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%). Os resultados representam a MÉDIA ± SEM de 4 experimentos independentes. a para ANOVA  $p < 0,05$  em relação ao controle.

Continua.



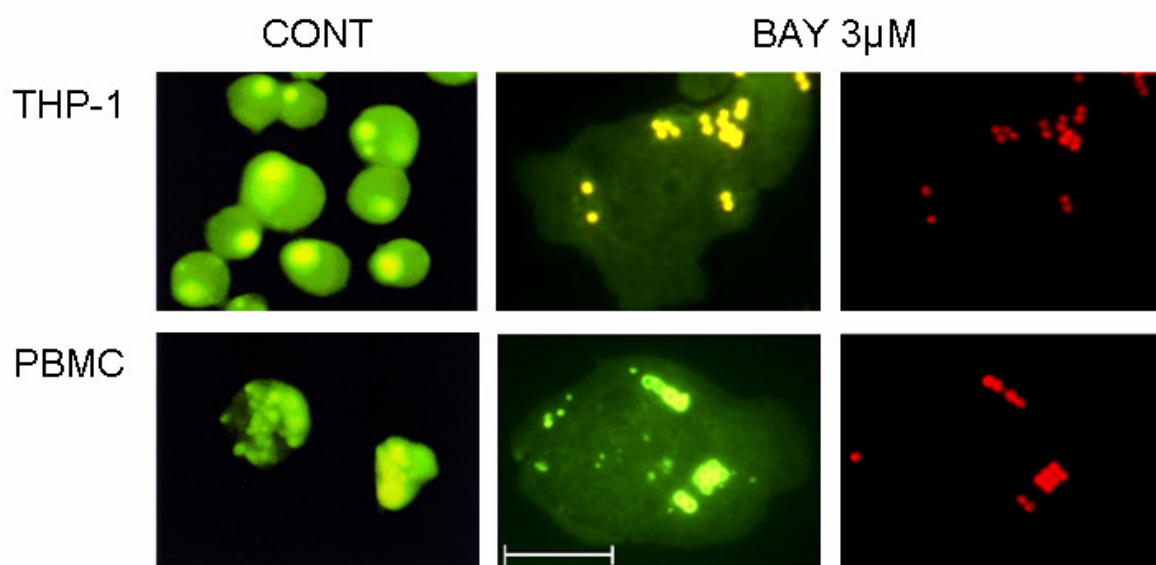
**BAY 41-2272 não possui efeito citotóxico sobre células THP-1, PBMC e PMN.** Análise da viabilidade das células THP-1 (a), PBMC (b) e PMN (c), tratadas por 1h, 12h, 24h, 48h ou 72h com BAY 41-2272 (0,1 $\mu$ M, 0,3 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M). Os resultados representam a MÉDIA  $\pm$  SEM de 4 experimentos independentes a para ANOVA  $p < 0,05$  em relação ao controle.

Conclusão.

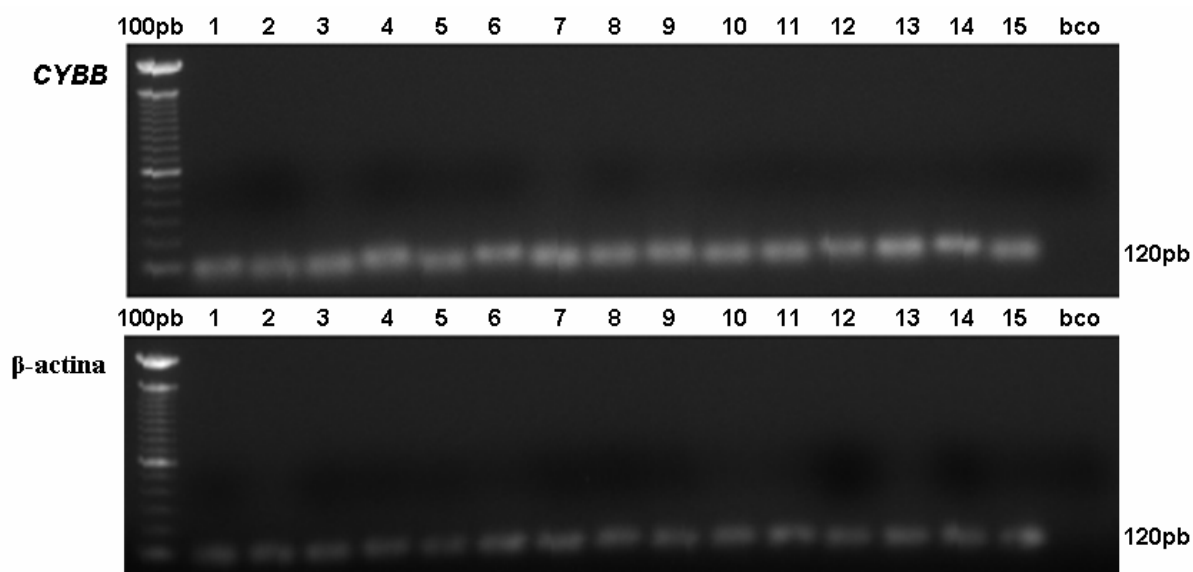
**ANEXO C – DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINA G E IMUNOGLOBULINA M  
SÉRICAS TOTAIS.**

<b>Amostra</b>	<b>IgG Total (mg/dL)</b>	<b>IgM Total (mg/dL)</b>
01	1230	332
02	752	137
03	945	265
04	1147	315
05	1278	78
06	698	132
07	747	214
08	1320	98
09	1570	102
10	843	294
11	1160	117
12	938	93
13	1254	159
14	904	185
15	890	172
16	1138	227
17	1403	265
18	1372	>378
19	1508	349
20	1147	156
21	1022	84
22	724	>378
23	898	>378
24	1027	<56

Valores de referência para adultos: IgG: 680 – 1601 mg/dL; IgM: 56 – 378 mg/dL (Fujimura, 1990).

**ANEXO D – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA POR MICROSCOPIA**

**Microscopia confocal de células THP-1 e PBMC** tratadas ou não por 48 horas com BAY 41-2272 (3  $\mu$ M), após 120 minutos de incubação com EPEC. Marcação feita com *acridine orange* (AO) e leitura em filtros individuais de comprimento de onda. Quadro à esquerda representa as células sem tratamento; quadro ao centro representa células tratadas com bactérias fagocitadas; e à direita o quadro mostra a marcação em vermelho, representando as bactérias mortas.

**ANEXO E – ELETROFORESE DA PCR EM TEMPO REAL**

**Corrida eletroforética das amostras de PCR em tempo real.** Avaliação da expressão do gene *CYBB* em células THP-1 (1-5), PBMC (6-10) e neutrófilos (11-15) tratados ou não (1, 2, 6, 7, 11 e 12) com IFN- $\gamma$  100 U/mL (3, 8 e 13), BAY 41-2272 1  $\mu$ M (4, 9 e 14) ou 3  $\mu$ M (5, 10 e 15) por 1h (neutrófilos) ou 48 h (THP-1 e PBMC).



## ANEXO F – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### GRUPO EXPERIMENTAL

(maiores de 21 anos)

ESTUDO: BAY 41-2272: uma ferramenta farmacológica potencial para o controle de infecções em imunodeficientes.

*Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.*

Eu (nome e profissão), \_\_\_\_\_, residente e domiciliado a \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, portador da cédula de identidade, RG \_\_\_\_\_, e inscrito no CPF/MF \_\_\_\_\_, nascido (a) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário (a) do estudo “Efeito do BAY 41-2272 e doadores de óxido nítrico sobre o desenvolvimento e regulação do sistema NADPH oxidase na linhagem mielomonocítica humana.”, declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

O principal objetivo deste estudo é avaliar o efeito do fármaco em questão, o BAY 41-2272, e de doadores de óxido nítrico na expressão dos componentes da NADPH oxidase (defeituosa nos pacientes com Doença Granulomatosa Crônica) e na atividade microbicida, ou seja, na capacidade de eliminar patógenos como bactérias e fungos.

Estou ciente que:

- I) O estudo é necessário para que possamos descobrir novos mecanismos de tratamento para a **“Doença Granulomatosa Crônica”**;
- II) Serão realizados:
  - a) exame de sangue que consistirá de uma extração de no máximo 20 mL de sangue, num período de 1 mês. Os riscos da retirada de sangue são: hematoma local (rouxidão), algum desconforto e, raramente, tontura.
- III) Essa(s) coleta(s) será(ão) feita(s) apenas para este estudo e, para os pacientes com doença granulomatosa crônica, em nada influenciará(ão) o meu tratamento; não vai(vão) me curar; não vai(vão) me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).
- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento e não será cobrado nenhum valor com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este projeto serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

Obs.: Assinalar com **X**. ( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

- IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/Usp, no telefone (11) 3091-7733 ou telefone do pesquisador Paulo Vítor Soeiro Pereira ou Dr. Antonio Condino Neto, (11) 3091-7435 para tirar qualquer dúvida ou fazer qualquer reclamação em relação ao presente estudo.

Estes estudos podem melhorar o entendimento da doença levando à formas mais eficazes de diagnóstico e tratamento no futuro. É provável que o voluntário em questão não possa aproveitar diretamente estes avanços.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

**Paciente:** \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

**Testemunha 1:** \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

**Testemunha 2:** \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

**Responsável pelo Projeto:** \_\_\_\_\_  
PAULO VÍTOR SOEIRO PEREIRA