Paola Vendramini Ferreira Rosa

**Efeito do BAY 41-2272, estimulador de guanilato ciclase solúvel, em
neutrófilos humanos**

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

São Paulo

2018

Paola Vendramini Ferreira Rosa

**Efeito do BAY 41-2272, estimulador de guanilato ciclase solúvel, em
neutrófilos humanos**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Versão original

São Paulo

2018

Vendramini PFR. **Efeito do BAY 41-2272, estimulador de guanilato ciclase solúvel, em neutrófilos humanos.** [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Os neutrófilos estão entre as principais células da imunidade inata e são as primeiras células a migrarem para o sítio de infecção. O BAY 41-2272, estimulador de guanilato ciclase solúvel, é capaz de ativar fagócitos mononucleares e em neutrófilos diminuir migração *in vivo* e *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do BAY 41-2272, e sua via, como uma ferramenta farmacológica para modulação da função dos neutrófilos. Para isso foi realizado o tratamento *in vitro* dos PMNs com o BAY 41-2272. A viabilidade celular, quimiotaxia e funções efetoras como “*burst oxidativo*” e produção de citocinas foram avaliadas, observando-se que o BAY 41-2272, como ativador direto, não altera estas funções. No entanto, o pré-tratamento com BAY 41-2272 nas doses de 3 μ M e 30 μ M por uma hora, com subsequente ativação com PMA, mostrou perfil inibitório na quimiotaxia, produção da citocina IL-8 e no “*burst oxidativo*”. Foram avaliados também a expressão de moléculas como CD15, CD31, CD35, CD49d, CD63, CD66b, CD162 e a produção de GMPc. As moléculas de superfícies não mostraram alterações após tratamento direto com BAY 41-2272. A produção de GMPc foi induzida na dose de 30 μ M de BAY 41-2272 e pelo SNAP (doador de NO). Esses dados sugerem um potencial inibitório do BAY 41-2272 sobre a ação dos neutrófilos, e uma possível alternativa a ser explorada em seus aspectos translacionais na busca por novas terapias destinadas ao controle de doenças ligadas a inflamações crônicas e doenças auto-imunes.

Palavras chave: BAY 41-2272, neutrófilos, GCs, GMPc, inibitório

Vendramini PFR. **Efeito do BAY 41-2272, estimulador de guanilato ciclase solúvel, em neutrófilos humanos.** [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Neutrophils are the major cells of innate immunity and are the first cells to migrate to the site of infection. BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase stimulator, is capable of activating mononuclear phagocytes and in neutrophils decreasing migration in vivo and in vitro. The present work aimed to evaluate the potential of BAY 41-2272, and its pathway, as a pharmacological tool for modulating neutrophil function. For this, the in vitro treatment of PMNs with BAY 41-2272 was performed. Cell viability, chemotaxis and effector functions such as oxidative burst and cytokine production were evaluated, observing that BAY 41-2272, as a direct activator, does not alter these functions. However, pretreatment with BAY 41-2272 at the doses of 3 μ M and 30 μ M for one hour, with subsequent activation with PMA, showed an inhibitory profile in chemotaxis, IL-8 cytokine production and in the "oxidative burst". We also evaluated the expression of molecules such as CD15, CD31, CD35, CD49d, CD63, CD66b, CD162 and cGMP production. Surface molecules did not show changes after direct treatment with BAY 41-2272. The cGMP production was induced at the dose of 30 μ M BAY 41-2272 and for SNAP (NO donor). These data suggest an inhibitory potential of BAY 41-2272 on the action of neutrophils, and a possible alternative to be explored in its translational aspects in the search for new therapies aimed at the control of diseases linked to chronic inflammation and autoimmune diseases.

Keywords: BAY 41-2272, neutrophils, sGC, cGMP, inhibitory

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neutrófilos

Os neutrófilos constituem em torno de 50-70% dos leucócitos no sangue humano e são produzidos cerca de 10^9 células/kg/dia na medula óssea por um progenitor mielóide (Dancey et al., 1976). A maturação dos neutrófilos na medula óssea é regulada pela expressão de citocinas como o fator de estimulação de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) e pelo fator de estimulação de colônia de granulócitos (G-CSF) (Rosmarin et al., 2005). As principais funções dos fagócitos são o reconhecimento, a fagocitose e a eliminação de microrganismos, restos celulares e imunocomplexos circulantes (**Figura 1**).

Os neutrófilos migram para o local de ação atraídos por quimiocinas, e mediados por selectinas e integrinas passam da corrente sanguínea para o sítio de infecção. Após serem ativadas essas células têm um papel central na defesa contra bactérias e fungos, pois englobam e digerem microrganismos através da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso), são responsáveis pela liberação de grânulos proteicos contendo enzimas (colagenase, elastase e lisozimas), pela produção de citocinas e pela produção das “armadilhas extracelulares neutrofilicas” (do inglês, *neutrophil extracellular traps*, NETs) (Faurschou e Borregaard, 2003; Segal, 2005; Theilgaard-Monch et al., 2006; Bianchi et al., 2009; Nakayama, 2016).

A primeira reação dos neutrófilos contra patógenos invasores é a fagocitose, mecanismo pelo qual essas células internalizam microrganismos em fagossomos e pela fusão com grânulos intracelulares formam o fagolisossomo levando a degradação dos microrganismos por substâncias não-oxidativas e mecanismos oxidativos (Segal AW, 2005; Silva et al., 2016). A seguir, os neutrófilos liberam enzimas lisossomais, acidificam os fagossomos (pH 3 – 5.4), sintetizam peptídeos microbicidas (defensinas e proteínas catiônicas), produzem lactoferrina e liberam reativos derivados do oxigênio (Djaldeiti, et al., 2002; Segal AW, 2005).

Os mecanismos oxidativos consistem em espécies reativas do oxigênio (ROS) que são produzidas como consequência da atividade do complexo

NADPH oxidase que libera superóxido para o vacúolo fagocítico. As ROS oxidam as membranas celulares dos patógenos e levam a formação de pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais da bactéria, levando à morte das mesmas (Appelberg, 2006).

Figura 1 – Principais funções exercidas pelos neutrófilos na resposta imune.

Principais funções efectoras dos neutrófilos: 1 – Fagocitose e degradação de microorganismos no fagolisossomo. 2 – Resposta inflamatória (produção de citocinas). 3 – Exocitose de grânulos proteolíticos. 4 – Apoptose e fagocitose por dos PMNs mortos por macrófagos.

O sistema NADPH (do inglês, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase é um complexo enzimático fagossômico associado à membrana plasmática e se encontra em repouso em neutrófilos e macrófagos não ativados. 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 b558 na membrana

(El-Benna, et al., 2005). Um dos principais mecanismos de resposta dos fagócitos aos micróbios é conhecido como “*burst*” oxidativo, e durante esse processo o citocromo b_{558} funde-se à membrana do fagosossomo, pois p47-*phox*, p67-*phox*, p40-*phox* e GTPase Rac1/2 (unidades citosólicas do complexo NADPH oxidase) se movem para a membrana e ativam o citocromo b_{558} (Dinauer, 2005). O citocromo b_{558} é uma heme-proteína formada por duas subunidades: p22-*phox* e gp91-*phox*, que é altamente glicosilada, sendo este o centro redox que catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio (Stasia et al., 2002). Em neutrófilos em repouso o citocromo b_{558} se localiza junto com a proteína rap1A na membrana dos grânulos específicos ou vesículas secretórias. Durante a ativação celular, a fusão dessas organelas com a membrana plasmática leva a realocação desse complexo oxidase, com migração das subunidades p47- p67- p40 para a membrana plasmática formando um único complexo com o citocromo b_{558} , desse modo, após a ativação do NADPH oxidase ocorre a fosforilação de p47-*phox* e p67-*phox* (Faust L et al., 1995), com o início da explosão respiratória, havendo, desse modo, produção do ânion superóxido (O_2^-)

NADPH Oxidase

$$(NADPH + O_2 \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} NADP^+ + H^+ + 2O_2^-), \text{ o qual é convertido em peróxido de hidrogênio (H}_2\text{O}_2\text{) pela enzima superóxido dismutase (SOD)}$$

SOD

$$(O_2^- + O_2 + 2H \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} H_2O_2 + O_2), \text{ o sistema microbicida do peróxido de hidrogênio/mieloperoxidase halogenado ocorre através da seguinte reação:}$$

MPO

$$(H_2O_2 + 2Cl^- + H^+ \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} H_2O + Cl_2 + OH^-), \text{ sendo estes produtos extremamente tóxicos para os patógenos (Halliwell e Gutteridge, 1999).}$$

Os ROS estão envolvidos na morte de patógenos invasores e devido a rapidez e eficiência na produção dos reativos, a mensuração dos níveis de liberação destes é considerada um parâmetro importante na avaliação funcional de fagócitos (Witko-Sarsat, et al., 2000; Burg, Pillinger, 2001).

Outro fator importante na eliminação dos patógenos é o pH. O pH do meio, que pode ser alterado pelo influxo de íons H^+ e K^+ , dissocia os grupos ácidos ou básicos de proteínas, que fazem parte de estruturas dos patógenos, causando a desnaturação e as tornando acessíveis a enzimas proteolíticas, visto que muitos microorganismos são resistentes a variações bruscas de pH do meio, e desse modo, serão eliminados através da desnaturação de componentes presentes em suas estruturas. Além do que a movimentação desses mesmos íons, H^+ e K^+ , é importante para acidificação dos fagolisossomos, condição a qual os patógenos não conseguem sobreviver (Claus, et al., 1998; Reeves et al., 2002).

Além do pH, as enzimas lisossomais e os grânulos dos fagócitos constituem mecanismos não-oxidativos importantes para a degradação dos patógenos. Existem três tipos de grânulos principais sintetizados pelos neutrófilos: os grânulos primários ou azurófilos, que são os primeiros a serem produzidos e contém enzimas como mieloperoxidase (MPO) e outros três peptídeos microbicidas conhecidos como catepsina G, elastase e proteinase 3; os grânulos secundários como a lactoferrina se liga e sequestra ferro e cobre, funcionando como um competidor; e os grânulos terciários que contém gelatinase na ausência de lactoferrina, esses grupos de grânulos são responsáveis pela morte e digestão microbiana e são transferidos dos grânulos para o fagolisossomo (Weiss et al., 1978; Hibbs e Bainton, 1989; Bundgaard et al., 1994; Segal, 2005).

De forma indireta os neutrófilos podem atuar sobre outras células do sistema imune, pois a produção de citocinas e quimiocinas, como IL-6, TNF- α , IL-1 β e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1), é uma das funções primordiais para ativação de outras células e manutenção da resposta inflamatória. As citocinas/quimiocinas possuem a capacidade de recrutar e regular a resposta inflamatória de outras células, incluindo os macrófagos, as células T e os próprios neutrófilos. Essas células medeiam à resolução da inflamação, por meio da ativação da cascata de morte celular, o que evita danos subsequentes aos tecidos (Coussens e Werb, 2002; Theilgaard-Monch et al., 2006).

Por fim, a ativação do complexo NADPH oxidase pode ainda desencadear a ativação de grânulos intracelulares de proteases que são capazes de gerar “fibras” extracelulares, também chamadas de “armadilhas extracelulares neutrofílicas” (do inglês, *neutrophil extracellular traps*, NETs). As NETs são desencadeadas “*in vivo*” durante estados de emergência como infecções e sepse, elas amplificam a morte microbicida e servem como barreira física impedindo a disseminação dos microorganismos. Essas “armadilhas neutrofílicas” são formadas por componentes dos grânulos, como elastase e mieloperoxidase, e cromatina descondensada que degradam fatores de virulência e destroem microorganismos extracelulares (Brinkmann et al., 2004; Caudrillier et al., 2012; Almyroudis et al., 2013).

A homeostase da imunidade inata e suas células, principalmente os fagócitos, são de extrema importância para a defesa do organismo, pois uma resposta inflamatória exagerada nas funções efectoras dessas células pode acarretar quadros característicos de inflamação crônica como a doença de Behçet, asma ou até mesmo influenciar no quadro clínico de sepse. Dessa maneira, nosso grupo busca possíveis imunomoduladores da resposta imune, através da via da GCs–GMPc, a fim de tratar doenças crônicas como as citadas acima.

1.2. A via de sinalização Guanilato Cicalse solúvel (GCs) - GMP cíclico (GMPc) - PKG

O NO está presente em diversos mecanismos celulares e em eucariotos é produzido a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), por células do sistema imune (células dendríticas, NK, mastócitos, monócitos, macrófagos, células da microglia, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos), assim como outros tipos celulares envolvidos em reações imunes (células endoteliais, epiteliais, células vasculares do músculo liso, fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos, células mesangiais e células de Schwann).

Existem três formas de NOS: neuronal, endotelial e induzível (nNOS, eNOS e iNOS), as formas neuronal e endotelial são constitutivamente expressas e a iNOS é induzida por sinais imunes específicos. As isoformas

constitutivas geram níveis nanomolares de NO e são reguladas pela ligação de cálcio e calmodulina para consequente dimerização dessas enzimas (Bogdan C. 2000; Alderton et al. 2001; Dudzinski et al. 2006). O NO é produzido pelo endotélio vascular, exercendo importante função protetora nos vasos sanguíneos por ser antitrombótico, evitando dessa maneira a adesão de células circulantes, como os neutrófilos, e plaquetas (Gaboury et al., 1993). O nosso grupo investigou a função da via de sinalização desse óxido em monócitos humanos, por isso nosso trabalho é focado em estudar a via de sinalização desse gás, utilizando um estimulador de GCs (BAY 41-2272) independente de NO, em neutrófilos humanos.

Em neutrófilos foi demonstrado que tanto a produção de NO endógeno quanto os doadores de NO impedem significativamente o rolamento, a aderência e a transmigração dessas células, pois esse gás regula negativamente a expressão de diferentes membros de famílias de moléculas de adesão; como a molécula vascular de adesão celular I (VCAM-1), a molécula de adesão celular I (ICAM-1), a E-selectina (CD62E) e a P-selectina (CD62P). Além do mais o NO pode inibir a expressão e a função de integrinas, como CD11a e CD18 e aumentar a taxa de apoptose nos neutrófilos (Spiecker et al., 1998; Seti S. et al., 2000, Martinez-Ruiz A. Et al., 2011, Dubey M. et al., 2016). Na vasculatura de camundongos o rolamento e adesão de leucócitos são controlados principalmente pelo NO derivado das enzimas eNOS e nNOS (Lefer et al, 1999). Já durante a resposta inflamatória o recrutamento e adesão dos neutrófilos são regulados pela enzima iNOS. Por fim, o NO pode modular a produção de quimiocinas, como IP-10 e MIP-1, e inibir a atividade de quimiocinas como IL-8. (Bogdan C. 2000; Trifilieff et al., 2000).

O NO produzido pelas NOS se difunde pela membrana plasmática para ativar a GCs, através de receptores para ligantes gasosos como NO e CO (Agullo et al.2005). A interação de NO com a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) é bem definida sendo essa via de sinalização utilizada em diversos mecanismos celulares (Derbyshire, Marletta, 2012; Martin et al., 2012; Wang et al., 2012).

O primeiro relato da ação da guanilato ciclase foi feito em 1978 por Hughes e colaboradores através da estimulação e atividade enzimática dessa partícula no tecido intestinal através da ação de toxina estável de *Escherichia coli* (Hughes et al. 1978). A GCs é um heterodímero composto por duas subunidades, uma maior chamada α e a menor denominada γ , encontra-se expressa no citoplasma de quase todas as células dos mamíferos e é responsável por converter trifosfato de guanosina (GTP) no segundo mensageiro GMPc. Essa hemoproteína evoluiu para ligar seletivamente Óxido Nítrico (NO) mesmo na presença de oxigênio (Hobbs, 1997; Evgenov et al., 2006).

A via NO-GCs-GMPc (**Figura 2**) é responsável por diversos mecanismos como reações de defesa do hospedeiro, crescimento e proliferação celular, homeostase vascular e transmissão neuronal (Schmidt e Walter, 1998). A GCs apresenta um grupo prostético heme que se liga diretamente ao NO e forma um complexo denominado heme-feronitrosil (Pellicena P. et al., 2004). 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. Esta ativação causa uma elevação nos níveis de cGMP, o qual é clivado a partir do GTP pela GCs (Traylor e Sharma, 1992; Evgenov et al., 2006). Os efeitos biológicos do GMPc são mediados por três tipos principais de efetores intracelulares: proteínas quinases I e II dependente de GMPc, canais de íons acoplados a GMPc e fosfodiesterases (PDEs) acopladas a GMPc. A degradação de cGMPc é catalisada por diferentes famílias de PDEs (PDEs 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10 e 11) (Beavo JA, 1995; Hofmann et al., 2006). Mudanças endógenas no estado redox da GCs podem ser induzidas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (como superóxido e peroxinitrito), os quais são gerados em condições de stress oxidativo (Stasch et al., 2006).

Figura 2 – Via de sinalização do NO – GCs – GMPc.

O complexo Ca^{2+} /Calmodulina (CaM) se liga o enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS cataliza a oxidação da L-Arginina (L-Arg) em L-Citrulina (L-Cit) e óxido nítrico (NO). O NO se liga ao sítio heme (Fe^{2+}) da guanilato ciclase solúvel (GCs). Esta ligação leva ao aumento de GMPc e pirofosfato (PPi). GMPc então ativa GMPc acoplado a canais iônicos, fosfodiesterases (PDEs) e canais iônicos. Abreviaturas: $\alpha 1$ e $\beta 1$, subunidades de guanilato ciclase solúvel; CaM, calmodulina.

Dentre vários agentes efetores responsáveis por modular os efeitos das GCs existem as proteínas quinases dependentes de GMPc. As sequências primárias de ambas as subunidades da GCs possuem múltiplos sítios de fosforilação para ligação das proteínas quinases (PKA, PKC e PKG), que culminam na ativação de fatores de transcrição, como o CREB (Evgenov et al., 2006). Em relação à função da GCs estudos demonstraram que ligantes de TLRs inibem a quimiotaxia de neutrófilos, através da diminuição da expressão

dos receptores quimotáticos pela ação da via NO-GCs-PKG. Ainda demonstraram que a inibição da atividade da GCs aumentou a sobrevivência de camundongos em modelos de sepse, pois houve aumento da migração e do *clearance* bacteriano em neutrófilos (Paula-Neto et al., 2011).

Em alguns processos patológicos pode ocorrer redução da biodisponibilidade de NO comprometendo a sinalização da via NO-GMPc-PKG. Atualmente diversas moléculas são utilizadas como agonistas de GCs independente de óxido nítrico (Derbyshire ER e Marletta MA, 2012). Um desses estimuladores é o BAY 41-2272, fármaco utilizado no nosso estudo.

1.3. BAY 41-2272

A molécula derivada do YC-1 (3-[(5'-hidroximetil-2'-fúril)-1-benzil indazol]), de nome BAY 41-2272, foi descrita como um estimulador direto de GCs devido ao seu acoplamento a um sítio regulatório independente do NO (**Figura 3**). O BAY 41-2272 se liga a GCs em um sítio alostérico da enzima, na subunidade $\alpha 1$, a qual contém Cys238 e Cys243 (Becker et al., 2001; Liu e Wu, 2005). Esse composto não é uma droga doadora de NO e age em sinergismo com esse gás o que reflete na estabilização do complexo heme-nitrosil (Ko et al., 1994; Becker et al., 2002; Stasch et al., 2002; Bischoff e Stasch, 2004). O BAY 41-2272 ativa também a isoforma heterodimérica $\alpha 2/\beta 1$ da GCs. Uma região N-terminal do aminoácido 104 ao 401 da subunidade $\alpha 2$ da GCs representa o sítio de ligação para o BAY 41-2272 (Koglin et al., 2002).

Figura 3 - Estrutura do BAY 41-2272

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

Esse fármaco foi utilizado primeiramente para tratamento de disfunção erétil, e como potente vasodilatador foi utilizado em diversos tratamentos de doenças cardiovasculares demonstrando capacidade de prevenir hipertensão arterial, desenvolvimento de hipóxia pulmonar crônica em ratos espontaneamente hipertensos (Stastch et al., 2001; Thorsen et al., 2010), e de proteger em ratos, após bloqueio crônico do NO e tratamento com BAY 41-2272, o infarto do miocárdio e hipertrofia de cardiomiócitos (Zanfolin et al., 2006). Ainda em nível de sistema circulatório o BAY 41-2272 é capaz de induzir a produção de acetilcolina (Ach) e causar o relaxamento máximo da artéria aorta (Prawez et al., 2016), é capaz também de reduzir significativamente, dose e tempo dependentes, a proliferação das células do músculo liso vascular (VSM) de ratos via produção dos segundos mensageiros GMPc e AMPc (Mendelev et al., 2009). No sistema renal a administração de BAY 41-2272 em ratos deficientes de NO foi capaz de prevenir disfunção vesical (D'Ancona et al., 2010; Mónica et al., 2011), e em camundongos e coelhos BAY 41-2272 levou ao relaxamento do músculo detrusor da bexiga via GMPc e aparentemente o mecanismo que envolve o bloqueio do influxo de Ca^{2+} , independente de GMPc, também parece estar envolvido (Báu et al., 2010). Em ratos com disfunção erétil causada pela Diabetes Mellitus (DM) o tratamento com BAY 41-2272 foi capaz de reduzir o estado antioxidativo das células do tecido do corpo cavernoso (CC) desses animais, através da redução da produção de ROS, confirmada através da diminuição da expressão de gp91phox, p22phox e p47phox, além de levar ao relaxamento do CC através da produção de GMPc (Nunes et al., 2015).

No contexto da resposta imunológica o GMPc participa de vários processos, como diferenciação, quimiotaxia e proliferação celular, além da liberação de mediadores solúveis (Ciuman M et al, 2006). O nosso grupo estuda possíveis vias de atuação do BAY 41-2272 em células do sistema imune. Os nossos estudos demonstraram que o BAY 41-2272 ativa células pró-monocíticas humanas THP-1 e elevam os níveis de GMPc, confirmando a presença da via ativa de GCs em monócitos humanos. Observamos ainda que esse fármaco estimulou a produção de ânion superóxido e aumentou a

expressão da gp91 $PHOX$ em células THP-1 (Borges de Oliveira-Junior et al., 2007). Também foi comprovado pelo nosso grupo que o BAY 41-2272, em monócitos de sangue humano, induz a produção de reativos de oxigênio, aumenta a fagocitose e, de forma mais significativa, a atividade microbicida (Soeiro-Pereira et al., 2012). Além disso, em células mononucleares e neutrófilos humanos o NO e o BAY 41-2272 podem estimular a quimiotaxia e a adesão *in vitro* (Thomazzi SM, et al 2004).

Por essas características, o BAY 41-2272 mostrou ser uma ferramenta farmacológica apropriada para o estabelecimento de um estudo da via da GCs/GMPc em neutrófilos humanos. Ahluwalia e colaboradores (2003) descreveram que animais *knock out* para a enzima eNOS quando tratados com BAY 41-2272 mostraram um menor rolamento e uma menor adesão dos leucócitos quando comparados aos animais selvagens (WT), mostrando que esses eventos são dependentes e modulados pela GCs. Esse mesmo fármaco foi também usado para avaliar a agregação de plaquetas mostrando uma inibição plaquetária, confirmando que tal evento, assim como o efeito hipotensor, pode ser regulado pela via da GCs e são independentes de NO (Hobbs e Moncada, 2002). Seguindo a via GCs-GMPc também foi demonstrado que o YC-1, precursor do BAY 41-2272, e ativador de GCs é capaz de inibir funções efectoras dos neutrófilos humanos em uma via independente de GMPc e dependente de AMPc (Hwang et al, 2003).

Após observar esses resultados em monócitos/macrófagos obtidos pelo nosso grupo e toda literatura sobre o BAY 41-2272 postulamos que esse fármaco possa modular a função dos neutrófilos humanos. Nossa hipótese é que o tratamento *in vitro* com este fármaco terá um efeito imunomodulador sobre estas células. A comprovação do potencial desse fármaco trará, em médio / longo prazo, benefícios diretos para os pacientes com deficiências no sistema imune levando ao desenvolvimento de novas drogas imunomoduladoras para o tratamento de doenças do sistema imune.

6. CONCLUSÕES

O tratamento com BAY 41-2272 não induziu a produção de ROS, citocinas e não alterou o perfil fenotípico e de migração dos neutrófilos, no entanto o pré-tratamento com este fármaco apresenta potencial imunomodulador sobre os neutrófilos.

O tratamento com BAY 41-2272 por 1 hora ou 4 horas não altera a viabilidade celular dos neutrófilos.

O BAY 41-2272 não induziu quimiotaxia dos neutrófilos.

O pré-tratamento com BAY 41-2272 inibiu a quimiotaxia dos neutrófilos para a dose de 30 μ M.

O tratamento direto com BAY 41-2272 não alterou a produção de ROS nem a produção de citocinas. No entanto, o pré-tratamento com BAY 41-2272 inibiu a produção de ROS e citocinas nas doses de 3 μ M e 30 μ M.

O tratamento com BAY 41-2272 não altera o perfil fenotípico (CD16+ e CD66b+) dos neutrófilos.

O tratamento com BAY 41-2272 não altera a expressão de moléculas de superfície como CD15, CD31, CD35, CD49d, CD63, CD66b e CD162.

O tratamento com BAY 41-2272 induziu a produção de GMPc na dose de 30 μ M.

Nossos resultados nos permitem concluir que o BAY 41-2272, estimulador de guanilato ciclase solúvel, tem ação inibitória na ativação dos neutrófilos (produção de ROS e citocinas) e na quimiotaxia, de forma independente de GCs e dependente de GMPc. Dessa maneira, o tratamento com BAY 41-2272 abre perspectivas para possíveis tratamentos de patologias do sistema imunológico como sepse, asma e outros tipos de inflamações crônicas.

CAPITULO 2

1 – Tratamento dos neutrófilos de pacientes Behçet com BAY 41-2272

A doença de Behçet é uma inflamação generalizada nos vasos que afeta artérias e veias de todos os calibres levando a alterações nas funções endoteliais (Yazici Y & Yazucu H, 2010; Mazzocchi et al., 2016). Essa doença se caracteriza por vasculites muco-cutâneas, oculares, vasculares, nas articulações e até mesmo o envolvimento de problemas neurológicos (Direskeneli et al., 2001). Uma vez que vimos o perfil inibitório do BAY 41-2272 em neutrófilos de controles sadios tratamos “*in vitro*” neutrófilos de pacientes com inflamações crônicas, diagnosticados com Doença de Behçet. Nesses pacientes é comum o aumento de citocinas como IL-8 e TNF- α (Al-Dalaan, 1995; Yazici Y & Yazucu H, 2010; Mazzocchi et al., 2016), aumento da expressão de receptores de superfície como CD11, CD18, ICAM-I e E-selectina (Sahin et al., 1996; Mazzocchi et al., 2016), o que favorece a adesão dos neutrófilos nas paredes dos vasos levando ao aumento da inflamação. Há ainda aumento do fator de estimulação de colônia dos granulócitos (G-CSF), do fator de crescimento leucocitário e aumento da taxa de apoptose dos PMNs (Triolo et al., 1999; Kawakami et al., 2004).

2. Conclusão

O pré-tratamento com BAY 41-2272 em neutrófilos de pacientes Behçet inibiu a produção de ânion superóxido (4 horas de tratamento) e a produção da citocina IL-8. Nossos dados confirmam o potencial imunomodulador do BAY 41-2272 nos neutrófilos e nos abre perspectivas para tratamento dos sintomas da doença de Behçet relacionados aos PMNs.

REFERÊNCIAS

Adderley, S. P., et al. (2012). "Phosphodiesterases Regulate BAY 41-2272-Induced VASP Phosphorylation in Vascular Smooth Muscle Cells." Front Pharmacol **3**: 10.

Agullo, L., et al. (2005). "Membrane association of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in cardiomyocytes." Cardiovasc Res **68**(1): 65-74.

Ahluwalia, A., et al. (2004). "Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1386-1391.

Albiger, B., et al. (2007). "Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors." J Intern Med **261**(6): 511-528.

al-Dalaan, A., et al. (1995). "Enhanced interleukin 8 secretion in circulation of patients with Behcet's disease." J Rheumatol **22**(5): 904-907.

Alderton, W. K., et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.

Appelberg, R. (2006). "Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms." J Leukoc Biol **79**(6): 1117-1128.

Armstrong, R. (2001). "The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation." Int Immunopharmacol **1**(8): 1501-1512.

Barreda, D. R., et al. (2004). "Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors." Dev Comp Immunol **28**(5): 509-554.

Bau, F. R., et al. (2010). "Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle." Eur J Pharmacol **637**(1-3): 171-177.

Bawankule, D. U., et al. (2005). "BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine]-induced dilation in ovine pulmonary artery: role of sodium pump." J Pharmacol Exp Ther **314**(1): 207-213.

Beachboard, D. C. and S. M. Horner (2016). "Innate immune evasion strategies of DNA and RNA viruses." Curr Opin Microbiol **32**: 113-119.

Beavo, J. A. (1995). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms." Physiol Rev **75**(4): 725-748.

Becker, E. M., et al. (2001). "NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272." BMC Pharmacol **1**: 13.

Bengis-Garber, C. and N. Gruener (1996). "Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst." Cell Signal **8**(4): 291-296.

Benz, P. M., et al. (2009). "Differential VASP phosphorylation controls remodeling of the actin cytoskeleton." J Cell Sci **122**(Pt 21): 3954-3965.

Bianchi, M., et al. (2009). "Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis." Blood **114**(13): 2619-2622.

Bischoff E, Stasch JP. Effects of the sGC stimulator BAY 41-2272 are not mediated by phosphodiesterase 5 inhibition. *Circulation*. 2004;110(12):e320-1; author reply e-1.

Bogdan, C. The function of nitric oxide in the immune system. in *Handbook of Experimental Pharmacology. Volume: Nitric Oxide* (ed. Mayer, B.) 443–492 (Springer, Heidelberg, 2000).

Bonecchi, R., et al. (1999). "Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils." J Immunol **162**(1): 474-479.

Borges de Oliveira-Junior, E., et al. (2007). "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 **567**(1-2): 43-49.

Boulay, F., et al. (1997). "Phagocyte chemoattractant receptors." Ann N Y Acad Sci **832**: 69-84.

Bouron, A., et al. (2016). "Second Messenger-Operated Calcium Entry Through TRPC6." Adv Exp Med Biol **898**: 201-249.

Brinkmann, V., et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.

Brzozowski, T., et al. (2003). "Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin." Int J Colorectal Dis **18**(4): 320-329.

Bundgaard, J. R., et al. (1994). "Molecular cloning and expression of a cDNA encoding NGAL: a lipocalin expressed in human neutrophils." Biochem Biophys Res Commun **202**(3): 1468-1475.

Bustamante J, Arias AA, Vogt G, Picard C, Galicia LB, Prando C et al. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked

predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat Immunol*. 2011 Mar; 12(3):213-21.

Butt, E., et al. (1994). "cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets." *J Biol Chem* **269**(20): 14509-14517.

Cabal-Hierro, L. and P. S. Lazo (2012). "Signal transduction by tumor necrosis factor receptors." *Cell Signal* **24**(6): 1297-1305.

Carroll, M. C. and M. B. Fischer (1997). "Complement and the immune response." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 64-69.

Caudrillier, A., et al. (2012). "Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury." *J Clin Invest* **122**(7): 2661-2671.

Chan, Y. K. and M. U. Gack (2016). "Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing." *Nat Rev Microbiol* **14**(6): 360-373.

Chen, L., et al. (2004). "Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(8): 1403-1408.

Chin, K. V., et al. (2002). "Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling." *Ann N Y Acad Sci* **968**: 49-64.

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

Claus, V., et al. (1998). "Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes." *J Biol Chem* **273**(16): 9842-9851.

Clements, M. K., et al. (2003). "Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses." *J Leukoc Biol* **73**(3): 344-355.

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

Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* **420**(6917): 860-867.

Currie, M. G., et al. (1992). "Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(3): 947-951.

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

Dal Secco, D., et al. (2006). "Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase." Nitric Oxide **15**(1): 77-86.

Dancey, J. T., et al. (1976). "Neutrophil kinetics in man." J Clin Invest **58**(3): 705-715.

D'Ancona, C. A., et al. (2010). "Administration of BAY 41-2272 prevents bladder dysfunction in nitric-oxide deficient rats." Einstein (Sao Paulo) **8**(4): 404-409.

De Rosa, F. G., et al. (2009). "Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines." Minerva Anesthesiol **75**(7-8): 453-458.

delaTorre, A., et al. (1999). "Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters

Derbyshire, E. R. and M. A. Marletta (2012). "Structure and regulation of soluble guanylate cyclase." Annu Rev Biochem **81**: 533-559.

Dinauer, M. C. (2005). "Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 89-95.

Djaldetti, M., et al. (2002). "Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors." Microsc Res Tech **57**(6): 421-431.

Dri, P., et al. (1999). "Role of the 75-kDa TNF receptor in TNF-induced activation of neutrophil respiratory burst." J Immunol **162**(1): 460-466.

Dubey, M., et al. (2016). "Nitric oxide-mediated apoptosis of neutrophils through caspase-8 and caspase-3-dependent mechanism." Cell Death Dis **7**(9): e2348.

Dudzinski, D. M., et al. (2006). "The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 235-276.

Duffy, L. and S. C. O'Reilly (2016). "Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases: recent and emerging translational developments." Immunotargets Ther **5**: 69-80.

Duhe, R. J., et al. (1998). "Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 126-131.

Errante PR, Frazao JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. Recent patents on anti-infective drug discovery. 2008;3(3):225-30.

Etzioni, A. (2007). "Leukocyte adhesion deficiencies: molecular basis, clinical findings, and therapeutic options." Adv Exp Med Biol **601**: 51-60.

Evgenov, O. V., et al. (2006). "NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 755-768.

Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." Microbes Infect **5**(14): 1317-1327.

Ferguson GJ, Milne L, Kulkarni S, Sasaki T, Walker S, Andrews S, et al. PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nature cell biology*. 2007;9(1):86-91.

Forslund, T. and T. Sundqvist (1995). "Nitric oxide regulates the chemiluminescence from stimulated human neutrophils." APMIS **103**(11): 813-817.

Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-1714.

Fortin, C. F., et al. (2009). "Autocrine role of endogenous interleukin-18 on inflammatory cytokine generation by human neutrophils." FASEB J **23**(1): 194-203.

Fratice, A., et al. (1996). "Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion." Biochim Biophys Acta **1310**(3): 251-259.

Friebe, A., et al. (1996). "Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme." EMBO J **15**(24): 6863-6868.

Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology*. 2013;17(4):1185-97.

Gadina, M., et al. (2001). "Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after." Curr Opin Immunol **13**(3): 363-373.

Gerzer, R., et al. (1982). "The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase." Biochem Biophys Res Commun **108**(2): 678-686.

Ghoreschi, K., et al. (2009). "Janus kinases in immune cell signaling." Immunol Rev **228**(1): 273-287.

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

Guzik, T. J., et al. (2003). "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation." J Physiol Pharmacol **54**(4): 469-487.

Haan, C., et al. (2006). "Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship." Biochem Pharmacol **72**(11): 1538-1546.

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

Hamra, F. K., et al. (1993). "Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10464-10468.

Hansbrough, J. R. and D. L. Garbers (1981). "Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa." J Biol Chem **256**(3): 1447-1452.

Hayashi, F., et al. (2003). "Toll-like receptors stimulate human neutrophil function." Blood **102**(7): 2660-2669.

Hewins P, Morgan MD, Holden N, Neil D, Williams JM, Savage CO, et al. IL-18 is upregulated in the kidney and primes neutrophil responsiveness in ANCA-associated vasculitis. Kidney international. 2006;69(3):605-15.

Hibbs MS, Bainton DF. Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. The Journal of clinical investigation. 1989;84(5):1395-402.

Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, Macmicking JD, Nathan C, et al. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1997;11(12):955-64.

Hobbs, A. J. and S. Moncada (2003). "Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272." Vascul Pharmacol **40**(3): 149-154.

Hofmann, F., et al. (2006). "Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion." Physiol Rev **86**(1): 1-23.

Hogg, N., et al. (1999). "A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1." J Clin Invest **103**(1): 97-106.

Holmskov, U., et al. (2003). "Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense." Annu Rev Immunol **21**: 547-578.

Hughes, J. M., et al. (1978). "Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of Escherichia coli." Nature **271**(5647): 755-756.

Ignarro, L. J., et al. (1982). "Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung." Biochim Biophys Acta **718**(1): 49-59.

Indolfi, C., et al. (1997). "Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury." Nat Med **3**(7): 775-779.

Jakus, Z., et al. (2008). "Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes." J Immunol **180**(1): 618-629.

Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.

Joshi, C. N., et al. (2011). "The soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 inhibits vascular smooth muscle growth through the cAMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase pathways." J Pharmacol Exp Ther **339**(2): 394-402.

Jozsef, L., et al. (2004). "CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes." FASEB J **18**(14): 1776-1778.

Kamenetsky, M., et al. (2006). "Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems." J Mol Biol **362**(4): 623-639.

Kawakami, T., et al. (2004). "Elevated serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with active phase of sweet syndrome and patients with active behcet disease: implication in neutrophil apoptosis dysfunction." Arch Dermatol **140**(5): 570-574.

Kern, S., et al. (1995). "Cytokine secretion by macrophages in the rat testis." Biol Reprod **53**(6): 1407-1416.

Kimura, T., et al. (2003). "Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils." Int Immunopharmacol **3**(10-11): 1519-1528.

- Klebanoff, S. J., et al. (1986). "Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor." J Immunol **136**(11): 4220-4225.
- Klink, M., et al. (2003). "Oxidative and adhesive responses of human neutrophils to nitrovasodilators in vitro: the role of protein kinases." Mediators Inflamm **12**(6): 345-353.
- Klink, M., et al. (2007). "Signal transduction pathways affected by nitric oxide donors during neutrophil functional response in vitro." Inflamm Res **56**(7): 282-290.
- Ko, F. N., et al. (1994). "YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase." Blood **84**(12): 4226-4233.
- Koglin, M., et al. (2002). "BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." Biochem Biophys Res Commun **292**(4): 1057-1062.
- Koller B, Bals R, Roos D, Korting HC, Griese M, Hartl D. Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. *European journal of clinical investigation*. 2009;39(7):535-47.
- Kostmann, R. (1956). "Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria." Acta Paediatr Suppl **45**(Suppl 105): 1-78.
- Krumenacker, J. S., et al. (2004). "Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase." Brain Res Bull **62**(6): 505-515.
- Kuroda, E., et al. (2013). "Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects." Int Rev Immunol **32**(2): 209-220.
- Lander, H. M., et al. (1997). "A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction." J Biol Chem **272**(7): 4323-4326.
- Langford, E. J., et al. (1994). "Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty." Lancet **344**(8935): 1458-1460.
- Lefer, D. J., et al. (1999). "Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice." Am J Physiol **276**(6 Pt 2): H1943-1950.
- Lehmann, D. M., et al. (2008). "Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation." Mol Pharmacol **73**(2): 410-418.
- Li, Z., et al. (2000). "Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction." Science **287**(5455): 1046-1049.

- Lin, P., et al. (2005). "Lysophosphatidylcholine modulates neutrophil oxidant production through elevation of cyclic AMP." J Immunol **174**(5): 2981-2989.
- Liu, Y. C. and S. N. Wu (2005). "BAY 41-2272, a potent activator of soluble guanylyl cyclase, stimulates calcium elevation and calcium-activated potassium current in pituitary GH cells." Clin Exp Pharmacol Physiol **32**(12): 1078-1087.
- Mantovani, A., et al. (2011). "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **11**(8): 519-531.
- Marcondes, S., et al. (2006). "Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3434-3439.
- Martin, E., et al. (2012). "Mechanism of binding of NO to soluble guanylyl cyclase: implication for the second NO binding to the heme proximal site." Biochemistry **51**(13): 2737-2746.
- Martinez-Ruiz, A., et al. (2011). "Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms." Free Radic Biol Med **51**(1): 17-29.
- Matthews, J. R., et al. (1996). "Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide." Nucleic Acids Res **24**(12): 2236-2242.
- Mazzocchi, G., et al. (2016). "Behcet syndrome: from pathogenesis to novel therapies." Clin Exp Med **16**(1): 1-12.
- McColl SR, Beauseigle D, Gilbert C, Naccache PH. Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha involves regulation at a post-cell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins. J Immunol. 1990;145(9):3047-53.
- Medzhitov, R. (2007). "TLR-mediated innate immune recognition." Semin Immunol **19**(1): 1-2.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.
- Mendelev, N. N., et al. (2009). "Antigrowth properties of BAY 41-2272 in vascular smooth muscle cells." J Cardiovasc Pharmacol **53**(2): 121-131.
- Mendelev, N. N., et al. (2009). "Antigrowth properties of BAY 41-2272 in vascular smooth muscle cells." J Cardiovasc Pharmacol **53**(2): 121-131.
- Merle, N. S., et al. (2015). "Complement System Part II: Role in Immunity." Front Immunol **6**: 257.

Migeotte, I., et al. (2006). "Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses." Cytokine Growth Factor Rev **17**(6): 501-519.

Monica, F. Z., et al. (2011). "Long-term administration of BAY 41-2272 prevents bladder dysfunction in nitric oxide-deficient rats." Neurourol Urodyn **30**(3): 456-460.

Mullershausen, F., et al. (2004). "Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272." Circulation **109**(14): 1711-1713.

Mullershausen, F., et al. (2004). "Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272." Circulation **109**(14): 1711-1713.

Nakayama, T. (2016). "An inflammatory response is essential for the development of adaptive immunity-immunogenicity and immunotoxicity." Vaccine **34**(47): 5815-5818.

Neves, F. S. and F. Spiller (2013). "Possible mechanisms of neutrophil activation in Behcet's disease." Int Immunopharmacol **17**(4): 1206-1210.
NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages." J Immunol **162**(7): 4101-4108.

Niu, X. F., et al. (1994). "Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils." Circ Res **74**(6): 1133-1140.

Nunes, K. P., et al. (2015). "Beneficial effect of the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 on impaired penile erection in db/db-/- type II diabetic and obese mice." J Pharmacol Exp Ther **353**(2): 330-339.

Ohlstein, E. H., et al. (1982). "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 **218**(1): 187-198.

O'Neill, L. A. (2008). "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress." Immunol Rev **226**: 10-18.

O'Shea, J. J. and R. Plenge (2012). "JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease." Immunity **36**(4): 542-550.

Paula-Neto, H. A., et al. (2011). "Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis." Shock **35**(1): 17-27.

Pellicena, P., et al. (2004). "Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 12854-12859.

Perazzio, S. F., et al. (2015). "Behcet's disease heterogeneity: cytokine production and oxidative burst of phagocytes are altered in patients with severe manifestations." Clin Exp Rheumatol **33**(6 Suppl 94): S85-95.

Prawez, S., et al. (2016). "BAY 41-2272 Treatment Improves Acetylcholine-Induced Aortic Relaxation in L-NAME Hypertensive Rats." Int J Angiol **25**(4): 235-240.

Rabinovitch, M. and M. J. DeStefano (1973). "Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading." Exp Cell Res **77**(1): 323-334.

Rapoport, R. M., et al. (1983). "Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation." Nature **306**(5939): 174-176.

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⁺ flux. Nature. 2002;416(6878):291-7.

Roger, S., et al. (2010). "The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide." Br J Pharmacol **161**(5): 1044-1058.

Rosmarin, A. G., et al. (2005). "Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis." Exp Hematol **33**(2): 131-143.

Russo, R. C., et al. (2014). "The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases." Expert Rev Clin Immunol **10**(5): 593-619.

Ryter A. Relationship between ultrastructure and specific functions of macrophages. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 1985;8(2):119-33.

Sahin, S., et al. (1996). "Neutrophil adhesion to endothelial cells and factors affecting adhesion in patients with Behcet's disease." Ann Rheum Dis **55**(2): 128-133.

Savina, A. and S. Amigorena (2007). "Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells." Immunol Rev **219**: 143-156.

Schindler, H. and C. Bogdan (2001). "NO as a signaling molecule: effects on kinases." Int Immunopharmacol **1**(8): 1443-1455.

Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch J-P (2009). NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol* 191: 309–339.
Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell*. 1994;78(6):919-25.

Schmidt, C. S., et al. (2016). "Phenotypic and functional characterization of neutrophils and monocytes from patients with myelodysplastic syndrome by flow cytometry." *Cell Immunol* **308**: 19-26.

Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology*. 2005;23:197-223.

Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology*. 2005;23:197-223.

Segal, A. W. (2005). "How neutrophils kill microbes." *Annu Rev Immunol* **23**: 197-223.

Serezani, C. H., et al. (2008). "Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function." *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**(2): 127-132.

Serezani, C. H., et al. (2008). "Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function." *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**(2): 127-132.

Sethi, S. and M. Dikshit (2000). "Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide." *Thromb Res* **100**(3): 223-247.

Shalaby, M. R., et al. (1985). "Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors." *J Immunol* **135**(3): 2069-2073.

Smith, C. W. (1993). "Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation." *Can J Physiol Pharmacol* **71**(1): 76-87.

Soeiro-Pereira, P. V., et al. (2012). "BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase agonist, activates human mononuclear phagocytes." *Br J Pharmacol* **166**(5): 1617-1630.

Spiecker, M., et al. (1998). "Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants." *J Leukoc Biol* **63**(6): 732-739.

Stasch, J. P. and A. J. Hobbs (2009). "NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators." *Handb Exp Pharmacol*(191): 277-308.

Stasch, J. P., et al. (2001). "NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase." *Nature* **410**(6825): 212-215.

Stasch, J. P., et al. (2002). "Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies." Br J Pharmacol **135**(2): 344-355.

Stasch, J. P., et al. (2006). "Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels." J Clin Invest **116**(9): 2552-2561.

Tamassia, N., et al. (2008). "Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils." J Immunol **181**(9): 6563-6573.

Teixeira, C. E., et al. (2006). "Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole]." J Pharmacol Exp Ther **317**(1): 258-266.

Teixeira, C. E., et al. (2006). "Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms." Hypertension **47**(3): 596-602.

Teixeira, C. E., et al. (2007). "Effects of 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine (BAY 41-2272) on smooth muscle tone, soluble guanylyl cyclase activity, and NADPH oxidase activity/expression in corpus cavernosum from wild-type, neuronal, and endothelial nitric-oxide synthase null mice." J Pharmacol Exp Ther **322**(3): 1093-1102.

Theilgaard-Monch, K., et al. (2004). "The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing." J Immunol **172**(12): 7684-7693.

Theilgaard-Monch, K., et al. (2006). "Systems biology of neutrophil differentiation and immune response." Curr Opin Immunol **18**(1): 54-60.

Thomazzi, S. M., et al. (2005). "Inhibitory effects on human eosinophil chemotaxis in vitro by BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase." Biochem Pharmacol **69**(6): 875-882.

Thorsen, L. B., et al. (2010). "BAY 41-2272 inhibits the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats." Eur J Pharmacol **647**(1-3): 147-154.

Tiitus, P. M. (1998). "Radical species in inflammation and overtraining." Can J Physiol Pharmacol **76**(5): 533-538.

Trifilieff, A., et al. (2000). "Inducible nitric oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression." J Immunol **165**(3): 1526-1533.

Triolo, G., et al. (1999). "Enhancement of endothelial cell E-selectin expression by sera from patients with active Behcet's disease: moderate correlation with anti-endothelial cell antibodies and serum myeloperoxidase levels." Clin Immunol **91**(3): 330-337.

Tuttle, T. R., et al. (2016). "The cyclic GMP/protein kinase G pathway as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Lett **370**(2): 279-285.

Wang, H., et al. (2012). "Structural and functional insights into the heme-binding domain of the human soluble guanylate cyclase alpha2 subunit and heterodimeric alpha2beta1." J Biol Inorg Chem **17**(5): 719-730.

Weiss, J., et al. (1978). "Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes." J Biol Chem **253**(8): 2664-2672.

Witko-Sarsat, V., et al. (2000). "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects." Lab Invest **80**(5): 617-653.

Wong, D., et al. (2004). "Nitric oxide regulates interactions of PMN with human brain microvessel endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **323**(1): 142-148.

Yazici, Y., et al. (2010). "Behcet's syndrome." Curr Rheumatol Rep **12**(6): 429-435.

Zanfolin, M., et al. (2006). "Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats." J Cardiovasc Pharmacol **47**(3): 391-395.

Zhang, H., et al. (2005). "The Src family kinases Hck and Fgr negatively regulate neutrophil and dendritic cell chemokine signaling via PIR-B." Immunity **22**(2): 235-246.

Zingarelli, B., et al. (2002). "Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF-kappaB and AP-1 activation and enhances myocardial damage." FASEB J **16**(3): 327-342.