

Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho

Efeito do BAY 41-2272 em Linfócitos T Humanos

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

São Paulo
2018

Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho

Efeito do BAY 41-2272 em Linfócitos T Humanos

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Tese Parcial

São Paulo

2018

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1.1 Imunidade Adaptativa

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

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

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

1.2 Linfócitos T CD4+

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Linfócitos T CD8⁺

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

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

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

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

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

1.4 Imunodeficiências primárias (IP) dos Linfócitos T

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

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

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

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

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

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

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

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

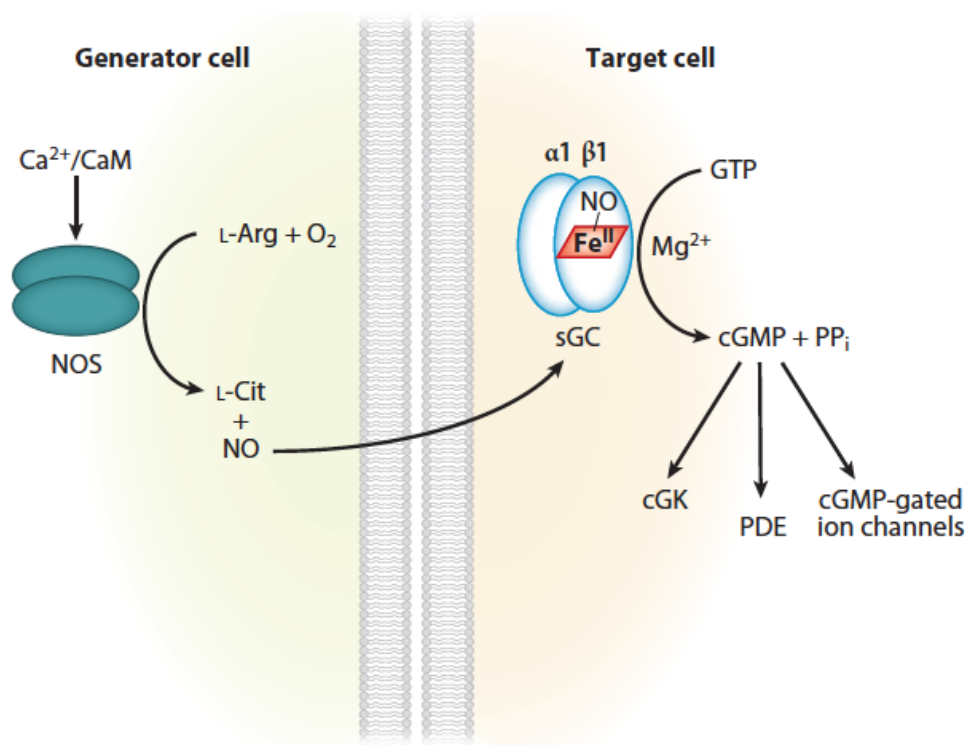
Apesar dos avanços obtidos na caracterização e diagnóstico, essas doenças ainda representam um desafio. O diagnóstico correto e precoce, além do tratamento adequado contribuem para um melhor prognóstico dos casos.

1.5 Via da Guanilato Ciclase Solúvel e BAY 41-2272

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

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

Figura 1 Via de sinalização NO/GMPc



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

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

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

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

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

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

CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O BAY 41-2272 não induziu a linfoproliferação linfócitos.

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Niedbala W, Alves-Filho JC, Fukada SY et al. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *PNAS*. 2011.108:22;9220-9225.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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