

EDGAR BORGES DE OLIVEIRA JÚNIOR

***EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE O SISTEMA NADPH
OXIDASE EM CÉLULAS MIELOMONOCÍTICAS HUMANAS,
THP-1***

CAMPINAS

2006

EDGAR BORGES DE OLIVEIRA JÚNIOR

***EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE O SISTEMA NADPH
OXIDASE EM CÉLULAS MIELOMONOCÍTICAS HUMANAS,
THP-1***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

CAMPINAS

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ol 4e Oliveira Júnior, Edgar Borges de
 Efeito do BAY 41-2272 sobre o sistema NADPH oxidase em
 células mielomonocíticas humanas, THP-1 / Edgar Borges de Oliveira
 Júnior. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Antonio Condino Neto
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Superóxido. 2. Óxido nítrico. I. Condino Neto, Antonio. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título em ingles : Effect of BAY 41-2272 on the NADPH oxidase system from human myelomonocytics cells, THP-1

Keywords: • Superoxide
 • Nitric oxide

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Antonio Condino Neto
 Prof Dr Marcelo Nicolas Muscará
 Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Data da defesa: 14-07-2006



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Membros:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 14/07/2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Edgar e Maria Helena, que me educaram mostrando e ensinando os verdadeiros valores da vida, sempre na fé e no amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e Maria, que sempre iluminou meus caminhos em todos os passos da minha vida.

À Renata, pelo apoio, compreensão e amor, minha companheira em todos os momentos, meu amor.

Ao meu orientador prof. Dr. Antonio Condino Neto, pela confiança e incentivo, abrindo portas para meu crescimento profissional e como ser humano.

Aos meus irmãos, Juliana e Júlio, pela amizade e pela torcida positiva.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular e todo o CIPED, pela amizade impar de cada um.

À Jussara, responsável por tudo o que sei dentro do laboratório, mas principalmente pela grande amizade e apoio.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos meus grandes amigos: Roberta e Rita, minhas cunhadas, James, Paulinho, Gabi, César. Pelos prazerosos momentos nos dias de distração e muitas risadas.

Ao prof. Dr. Edson Antunes, pela ajuda intelectual e por nos fornecer o BAY 41-2272 para o estudo.

À Dra Sara M. Thomazzi, pela brilhante co-orientação durante todo o trabalho, e principalmente pela grande amizade.

“Há duas formas para viver sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre...
...a outra é acreditar que todas as coisas são um milagre...”

Albert Einstein

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxxi
1. INTRODUÇÃO.....	36
1.1. Os Fagócitos.....	37
1.2. Sistema NADPH oxidase.....	38
1.3. Óxido Nítrico (NO).....	41
1.4. Nucleotídeos Cíclicos (GMPc e AMPc).....	43
1.5. BAY 41-2272.....	47
2. OBJETIVOS.....	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1. Condições de cultura celular.....	53
3.2. Tratamentos farmacológicos.....	53
3.3. Dosagem de Superóxido.....	55
3.4. Extração e Dosagem de GMPc e AMPc.....	56
3.5. Expressão gênica da gp91- <i>phox</i>	57
3.6. Materiais.....	59
3.7. Análise Estatística.....	59

4. RESULTADOS.....	60
4.1. Efeito do BAY 41-2272 na liberação de superóxido pelas células THP-1.....	61
4.2. Efeito do BAY 41-2272 na expressão da gp91- <i>phox</i> pelas células THP-1.....	66
4.3. Efeito do BAY 41-2272 nos níveis intracelulares de GMPc e AMPc pelas células THP-1.....	70
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC: Adenilato ciclase

A-DGC: DGC com herança autossômica

AMPc: Monofosfato de adenosina

ATP: Trifosfato de adenina

cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementar

CO₂: Gás carbônico

CYBB: Gene da subunidade b do citocromo b₅₅₈

dATC: Deoxinucleotídeo trifosfato de adenina

dCTC: Deoxinucleotídeo trifosfato de citosina

DGC: Doença Granulomatosa Crônica

dGTC: Deoxinucleotídeo trifosfato de guanina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxiribonucleico

dTTC: Deoxinucleotídeo trifosfato de timina

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

Fors: Forscolina

GCs: Guanilato ciclase solúvel

GMPC: Monofosfato de guanosina

gp91: Glicoproteína, 91 KDa

GTP: Trifosfato de guanina

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HOCl: Ácido hipocloroso

IFN- γ : Interferon-gama

Ilo: Iloprost

iNOS: óxido nítrico sintase induzida

IT: IFN- γ e TNF- α

MPO: Mieloperoxidase

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

NADP: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: Óxido Nítrico

O₂: Oxigênio molecular

O₂⁻: Superóxido

OH[·]: Radical hidroxila

ONOO⁻: peroxinitrito

pb: pares de bases

PCR: "Polimerase chain reaction"

PDEs: fosfodiesterases

phox: "phagocyte oxidase"

PKA: Proteína quinase A

PKC: Proteína quinase C

rac: proteína tipo ras ("related C3 Botulinum toxin")

RPMI: meio rico para cultura de células de mamíferos originalmente desenvolvido no
"Roswell Park Memorial Institute"

RT: "Reverse transcription"

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

SOD: Superóxido dismutase

Taq: *Termus aquaticus*

TNF- α : Fator de necrose tumoral

X-DGC: DGC com herança ligada ao X (sexo)

ZAP: Zaprinas

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1 : Representação esquemática do Sistema NADPH oxidase.....	38
Figura 2 : O efeito do BAY 41-2272 na liberação de superóxido por células THP-1 após 6, 12, 24 ou 48 horas de incubação.....	63
Figura 3 : O efeito do BAY 41-2272 na liberação de superóxido por células THP-1 após 48 horas de incubação.....	64
Figura 4 : Efeito do BAY 41-2272 em associação com ODQ (100,0 µM), SNAP (100,0 µM), L-NAME (100,0 µM), SQ 22.536 (100,0 µM), Forscolina (30,0 µM) e Iloprost (3,0 µM) na liberação de superóxido por células THP-1 após 48 horas de incubação.....	65
Figura 5 : Efeito do BAY 41-2272 na expressão da gp91- <i>phox</i> em céls THP-1.....	68
Figura 6 : Efeito do BAY 41-2272 em associação com ODQ (100,0 µM), SNAP (100,0 µM), L-NAME (100,0 µM), SQ 22.536 (100,0 µM), Forscolina (30,0 µM) e Iloprost (3,0 µM) na expressão da gp91- <i>phox</i> por células THP-1 após 48 horas de incubação.....	69
Figura 7 : Efeito do BAY 41-2272 (10,0 µM) sobre os níveis intracelulares de GMPc em células THP-1 após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação.....	72
Figura 8 : Efeito do BAY 41-2272 (10,0 µM) sobre os níveis intracelulares de GMPc em células THP-1 após 48 horas de incubação.....	73
Figura 9 : Efeito do BAY 41-2272 (10,0 µM) sobre os níveis intracelulares de AMPc em células THP-1 após 48 horas de incubação.....	74

RESUMO

Investigamos os efeitos do BAY 41-2272 (5-cyclopropyl-2- [1-(2-fluoro-benzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine) sobre a atividade do sistema NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase e expressão do gene CYBB que codifica seu componente principal, a proteína gp91-*phox* , simultaneamente aos níveis intracelulares de GMPc (cyclic guanosine-3', 5'-monophosphate) e AMPc (cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate) em células mielomonocíticas humanas THP-1.

Estas células foram pré-incubadas com Zaprinast (ZAP; 10,0 µM) durante 30 minutos e depois tratadas com BAY 41-2272 (10,0 µM) por 6, 12, 24 e 48 horas, ou BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 µM) por 48 horas na presença ou ausência de ODQ (100,0 µM) e/ou ZAP (10,0 µM).

Células tratadas com BAY 41-2272 nas concentrações de 0,3, 1,0 e 3,0 µM por 48 horas sem o pré-tratamento com ZAP também mostraram aumento na liberação de superóxido ($69,7 \pm 22,1\%$ $P < 0,05$; $88,6 \pm 9,0\%$ $P < 0,01$ e $105,3 \pm 15,0\%$ $P < 0,001$, respectivamente).

Células pré-incubadas com ZAP (10,0 µM) e tratadas com BAY 41-2272 durante 48 horas apresentaram aumento significativo da liberação de superóxido nas concentrações de 3,0 e 10,0 µM ($95,6 \pm 15,2\%$ $P < 0,01$ e $64,6 \pm 18,8\%$ $P < 0,05$, respectivamente). A incubação com ZAP (10,0 µM) ou ODQ (100,0 µM) por 48 horas não produz alterações significativas na liberação de superóxido. As células incubadas com BAY 41-2272 (3,0 µM) apresentaram aumento significativo na liberação de superóxido quando pré-incubadas com ZAP (10,0 µM; $45,4 \pm 3,3\%$ $P < 0,01$) e em associação com ODQ (100,0 µM; $31,8 \pm 2,0\%$ $P < 0,05$), SNAP (100,0 µM; $54,5 \pm 4,1\%$ $P < 0,05$), L-NAME (100,0 µM; $62,2 \pm 9,8\%$ $P < 0,05$), SQ 22.536 (100,0 µM; $63,3 \pm 2,1\%$ $P < 0,01$), Forscolina (30,0 µM; $35,6 \pm 1,5\%$ $P < 0,05$) ou

Iloprost (3,0 μ M; $22,5 \pm 0,9\%$ $P<0,01$), mostrando que essas drogas não interferiram na liberação de superóxido provocado pelo BAY 41-2272.

Observamos aumento na expressão da gp91-*phox* em células THP-1 tratadas com BAY 41-2272 (3,0 μ M) sozinho ($73,0 \pm 3,5\%$ $P<0,01$, expressão relativa), BAY 41-2272 (1,0, 3,0 e 10,0 μ M) na presença de ZAP (10,0 μ M; $181,4 \pm 21,4$ $P<0,05$; $257,0 \pm 43,5\%$ $P<0,01$ e $214,6 \pm 30,9\%$ $P<0,05$, respectivamente) e BAY 41-2272 (3,0 μ M) na presença de IBMX (0,5 mM; $55,8 \pm 0,6\%$ $P<0,01$).

Células THP-1 pré-incubadas com ZAP (10,0 μ M) e a seguir com BAY 41-2272 (10,0 μ M) por 6, 12, 24 ou 48 horas apresentaram aumento significativo nos níveis intracelulares de GMPc ($345,1 \pm 16,1\%$ $P<0,001$; $556,5 \pm 36,8\%$ $P<0,001$; $273,4 \pm 13,4\%$ $P<0,001$ e $231,1 \pm 41,2\%$ $P<0,001$, respectivamente), enquanto as células incubadas com BAY 41-2272 nas concentrações de 3,0 e 10,0 μ M durante 48 horas, também com pré-incubadas com ZAP, apresentaram aumento significativo nos níveis intracelulares de GMPc ($74,5 \pm 9,4\%$ $P<0,05$ e $284,7 \pm 25,0\%$ $P<0,01$, respectivamente). As células incubadas com BAY 41-2272 (0,3, 1,0, 3,0 e 10,0 μ M) por 48 horas também apresentaram aumento significativo nos níveis intracelulares de AMPc ($47,9 \pm 1,8\%$ $P<0,01$; $40,2 \pm 2,1\%$ $P<0,05$; $49,1 \pm 2,2\%$ $P<0,01$ e $58,5 \pm 4,7\%$ $P<0,001$, respectivamente).

Concluimos que o composto BAY 41-2272 causou aumento significativo na liberação de superóxido e na expressão da gp91-*phox* em células mielomonocíticas humanas THP-1. A elevação dos níveis intracelulares de GMPc e AMPc também foram significativas sugerindo que estes nucleotídeos possam estar envolvidos pelo menos em parte na regulação transcricional do sistema NADPH oxidase em células mielomocíticas humanas imaturas.

ABSTRACT

We investigated the effects of the BAY 41-2272 (5-cyclopropyl-2- [1-(2-fluoro-benzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*] pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine) on the NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase system, gene expression of gp91-*phox*, cGMP (cyclic guanosine-3', 5'-monophosphate) levels, and cAMP (cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate) levels, in the human myelomonocytic THP-1 cells. These cells were pre-incubated for 30 min. with Zaprinast (ZAP; 10.0 μ M) followed by treatment with BAY 41-2272 (10.0 μ M) for 6, 12, 24 and 48 h, or BAY 41-2272 (0.3 to 10.0 μ M) for 48 h in presence or absence of ODQ (100.0 μ M) and/or ZAP (10.0 μ M).

Pre-incubation with ZAP and treatment with BAY 41-2272 significantly increases the superoxide release when these cells were exposed to this agent for 48 h in the concentration of 3.0 and 10.0 μ M ($95.6 \pm 15.2\%$ $P < 0.01$ and $64.6 \pm 18.8\%$ $P < 0.05$, respectively). Cells treated with BAY 41-2272 in the concentrations of 0.3, 1.0 and 3.0 μ M for 48 h in the absence of ZAP were also able to markedly increase the superoxide release ($69.7 \pm 22.1\%$ $P < 0.05$; $88.6 \pm 9.0\%$ $P < 0.01$ and $105.3 \pm 15.0\%$ $P < 0.001$, respectively). THP-1 cells treated only with ZAP (10.0 μ M), and ODQ (100.0 μ M) for 48 h did not influence the superoxide release. THP-1 cells pre-incubated with ZAP (10.0 μ M; $45.4 \pm 3.3\%$ $P < 0.01$) in association with ODQ (100.0 μ M; $31.8 \pm 2.0\%$ $P < 0.05$), SNAP (100.0 μ M; $54.5 \pm 4.1\%$ $P < 0.05$), L-NAME (100.0 μ M; $62.2 \pm 9.8\%$ $P < 0.05$), SQ 22,536 (100.0 μ M; $63.3 \pm 2.1\%$ $P < 0.01$), Forskolin (30.0 μ M; $35.6 \pm 1.5\%$ $P < 0.05$) or Iloprost (3.0 μ M; $22.5 \pm 0.9\%$ $P < 0.01$), all in presence of BAY 41-2272 (3.0 μ M) showed a significant increase on superoxide release.

BAY 41-2272 (3.0 μ M) also increased gp91-*phox* gene expression by THP-1 cells ($73.0 \pm 3.5\%$ $P < 0.01$, relative expression). BAY 41-2272 (1.0, 3.0 and 10.0 μ M) in the presence of ZAP (10.0 μ M) ($181.4 \pm 21.4\%$ $P < 0.05$; $257.0 \pm 43.5\%$ $P < 0.01$ and $214.6 \pm 30.9\%$ $P < 0.05$,

respectively) or BAY 41-2272 (3.0 μ M) in the presence of IBMX (0.5 mM) ($55.8 \pm 0.6\%$ $P < 0.01$) also increased gp91-phox gene expression.

Treatment of THP-1 cells with BAY 41-2272 (10.0 μ M) for 6, 12, 24 or 48 h caused a significant increase in the cGMP levels ($345.1 \pm 16.1\%$ $P < 0.001$; $556.5 \pm 36.8\%$ $P < 0.001$; $273.4 \pm 13.4\%$ $P < 0.001$ and $231.1 \pm 41.2\%$ $P < 0.001$, respectively), while BAY 41-2272 alone, at 3.0 or 10.0 μ M during 48 h also caused an increase in cGMP levels ($74.57 \pm 9.4\%$ $P < 0.05$ and $284.7 \pm 25.0\%$ $P < 0.01$, respectively). BAY 41-2272 (0.3, 1.0, 3.0 and 10.0 μ M) for 48h also elevated cAMP levels in THP-1 cells ($47.9 \pm 1.8\%$ $P < 0.01$; $40.2 \pm 2.1\%$ $P < 0.05$; $49.1 \pm 2.2\%$ $P < 0.01$ and $58.5 \pm 4.7\%$ $P < 0.001$, respectively). Our findings show that BAY 41-2272 caused a significant increase on the superoxide release and gp91-phox gene expression by THP-1 cells. The elevation of cGMP and cAMP levels have also showed, that they may be involved at least in part in these intra-cellular mechanisms.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os Fagócitos

Para a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos como bactérias, fungos ou parasitas ser efetiva, é preciso a participação de células do sistema imunológico denominadas fagócitos (BURG & PILLINGER, 2001).

O sistema fagocítico compreende dois grupos principais de células: os fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos teciduais) e os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Os fagócitos mononucleares possuem vida média de 1 a 3 dias no compartimento intravascular e atuam principalmente como células residentes, os macrófagos, em certos tecidos, como pulmão, fígado, peritônio e baço, onde podem permanecer por meses ou até anos. Ao contrário, os granulócitos permanecem na corrente sanguínea em média 6 a 8 horas, até encontrarem sinais quimiotáticos específicos que promovam a adesão ao endotélio, diapedese e migração para os locais onde exista invasão de agentes patogênicos. Outra característica que diferencia estes dois grupos de células é a capacidade de replicação de monócitos e macrófagos, em contraste aos granulócitos, que não se replicam, seja na circulação ou nos tecidos. Para exercerem seu papel imunoprotetor, os fagócitos são munidos de um sistema enzimático denominado NADPH oxidase.

1.2. Sistema NADPH oxidase

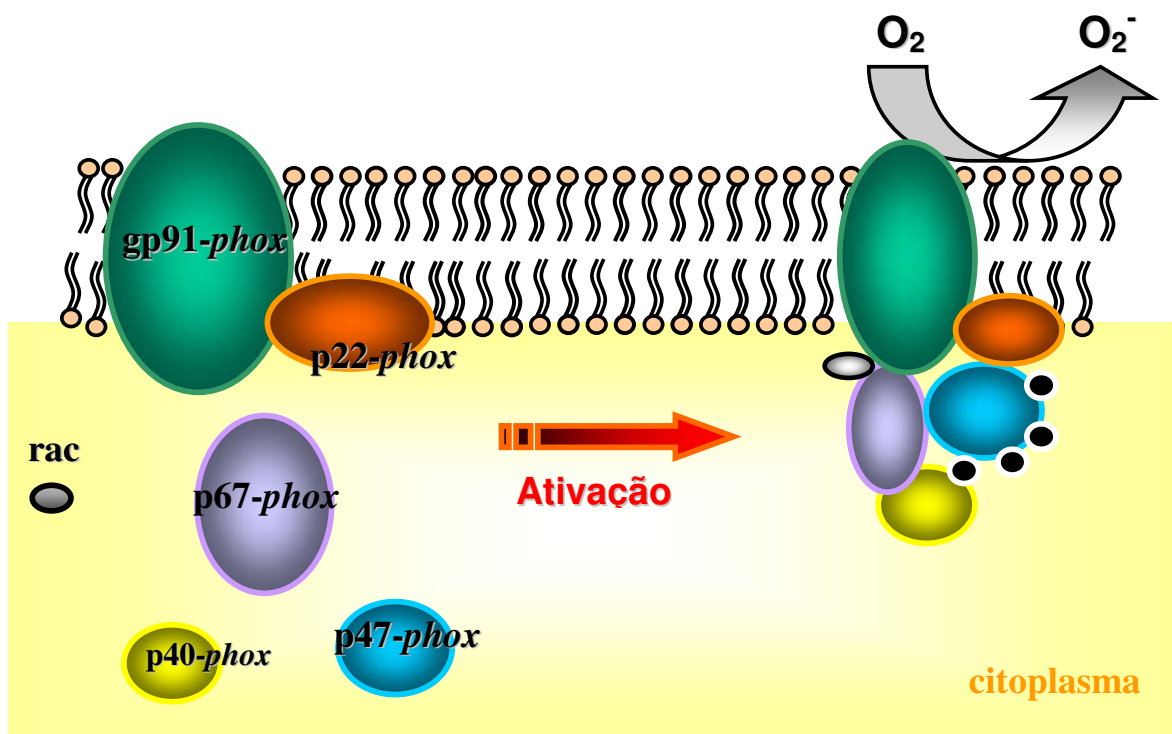


Figura 1 Representação esquemática do Sistema NADPH oxidase com seus principais componentes: gp91-*phox* e p22-*phox* ligados a membrana celular formando o citocromo b₅₅₈; p67-*phox*, p47-*phox*, p40-*phox* e a proteína rac presentes no citoplasma do fagócito. A ativação do Sistema ocorre com a fosforilação da p47-*phox* seguida do agrupamento de todos os componentes junto ao citocromo b₅₅₈ reduzindo o oxigênio molecular (O₂) levando a formação do superóxido (O₂⁻).

A clássica NADPH (“reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”) oxidase tem um papel central na ação microbicida e defesa do hospedeiro. O sistema NADPH oxidase consiste em duas subunidades enzimáticas ligadas à membrana, uma glicoproteína de 91-kDa (gp91-*phox*) e uma proteína de 22-kDa (p22-*phox*). A gp91-*phox*, também denominada Nox 2, possui seis domínios de membrana, carrega dois hemes, e contém um sítio de ligação da NADPH. Esta glicoproteína interage com a p22-*phox* formando um complexo chamado citocromo *b*₅₅₈ (BRANDES & KREUZER, 2005). O sistema é constituído também pelas proteínas p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox*, que são encontradas no citosol dos fagócitos e rac2, uma proteína citosólica tipo *ras* (BURG & PILLINGER, 2001). A ativação dos fagócitos leva à associação dos componentes deste complexo enzimático, iniciando o fenômeno da explosão respiratória.

A vital importância deste sistema enzimático é ilustrada numa desordem genética humana denominada doença granulomatosa crônica (DGC), imunodeficiência primária associada a infecções recorrentes graves por bactérias e fungos. Estes pacientes apresentam atividade microbicida defeituosa, resultado da baixa produção de superóxido, secundária a mutações que afetam componentes do sistema NADPH oxidase (HOLMES et al., 1966; HOLMES et al., 1967; ROOS et al., 1996; BABIOR, 2004; EL-BENNA et al., 2005).

A DGC foi descrita como uma entidade clínica em 1957, a qual acometia crianças do sexo masculino com pneumonia, linfadenite e abscessos localizados em diferentes áreas (BERENDES et al., 1957; LANDING & SHIRKEY, 1957; BRIDGES et al., 1959). Clinicamente caracteriza-se como imunodeficiência grave e rara (incidência estimada em 1/250.000 nascidos vivos por ano), de manifestação precoce, na qual os quadros infecciosos por bactérias como *Staphylococcus aureus* e bacilos gram-negativos, e fungos como

Aspergillus, *Candida* e *Nocardia*, ocorrem predominantemente em locais considerados barreiras naturais do organismo (SEGAL et al., 1982; TAUBER et al., 1983).

O defeito molecular da DGC reside na ausência, baixa expressão ou mal funcionamento de um dos componentes do sistema NADPH oxidase. Assim, na forma ligada ao sexo (X-DGC), é afetada a cadeia pesada do citocromo *b*₅₅₈, no caso, o componente gp91-*phox* (56% dos casos) (DINAUER et al., 1987). Nas formas autossômicas recessivas (A-DGC) é afetado um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, respectivamente a p47-*phox* ou p67-*phox* (33% e 5% dos casos) (CLARK et al., 1989); ou ainda a cadeia leve do citocromo *b*₅₅₈, o componente p22-*phox* (6% dos casos) (PARKOS et al., 1988; DINAUER et al., 1990).

Sabemos que os pacientes com DGC melhoram após tratamento com IFN- γ . O mecanismo de ação, inicialmente atribuído à regulação positiva da NADPH oxidase e iNOS, não se confirmou. Portanto o mecanismo de ação do IFN- γ na DGC permanece obscuro.

Foi investigada a modulação na liberação de NO (nitrito e nitrato) pela terapia com o IFN- γ em pacientes com DGC, tentando-se correlacionar com os benefícios decorrentes do tratamento, o que não foi confirmado, mantendo assim a dúvida sobre como o IFN- γ protege os pacientes com DGC das infecções (CONDINO-NETO et al., 1996). Porém, foi demonstrado em leucócitos provenientes também de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica, que estes liberam NO (molecular) normalmente. Pode-se considerar assim que a característica fundamental desta doença é a ausência da produção de superóxido, secundária a defeitos moleculares geneticamente determinados. Concluiu-se então que a explosão

respiratória pelo sistema NADPH oxidase não é essencial para a síntese de NO, em leucócitos humanos (AHLIN et al., 1999).

Combinações de IFNs e agentes que induzem aumento de AMPc intracelular, assim como cólera toxina, prostaglandina E1, forskolina e isoproteranol induziram diferenciação, avaliado pela redução do NBT (nitrobluetetrazolium) e maturação morfológica como receptores Fc, de células mielomonocíticas humanas U937 e THP-1 e em linhagem mieloblástica humana ML-1 (IWANAMI et al., 1990).

1.3. Óxido Nítrico (NO)

As enzimas responsáveis pela síntese de NO endógeno, são denominadas NO-sintases (NOS) consideradas dioxigenases, na medida que incorporam oxigênio molecular ao nitrogênio guanidino terminal da L-arginina.

São descritas três isoformas de NOS, entre elas a NO-sintase neuronal (nNOS, ou NOS1), a NO-sintase induzível (iNOS, ou NOS2) e a NO-sintase endotelial (eNOS, ou NOS3). As isoformas nNOS e eNOS são também conhecidas coletivamente como NOS-constitutiva (cNOS). Isto porque, diferente de iNOS, elas geralmente existem como proteínas expressas constitutivamente e reguladas por fluxo de cálcio (MACMICKING et al., 1997). Sua expressão não é restrita somente aos neurônios ou células endoteliais. As isoformas de NOS são ativas somente como homodímeros. A dimerização requer calmodulina, e incorporação de heme. Para nNOS e iNOS, os dímeros são, além disso, estabilizados por tetrahydrobiopterina (BH₄), que é um dos cofatores de NOS e do substrato L-arginina (STUEHR, 1999).

Essas três isoformas catalisam a mesma reação, na conversão de L-arginina e oxigênio molecular para N-hidroxyl-L-arginina, além da produção de Citrulina e NO. Elas diferem principalmente em suas regulações, amplitudes e duração da produção de NO. Também diferem em sua distribuição celular (MACMICKING et al., 1997; STUEHR, 1999).

A atividade de NOS é determinada por vários mecanismos, muitos deles controlados por estímulos imunológicos. Está bem definido, por exemplo, a interação de NO com a guanilato ciclase solúvel (GCs), embora uma grande porção de NO formado no tecido vascular seja retirado ou neutralizado pela hemoglobina (CHAKRAVORTTY et al., 2001; CHAN et al., 2001; KRISTOF et al., 2001).

Em linhagem celular mielomonocítica humana, U937, foram detectados mRNA e proteínas de eNOS. A enzima ativa é dependente de Ca^{2+} e calmodulina e resulta em acúmulo de GMPc sugerindo que estas células possuem uma outra enzima, a GCs (ROMAN et al., 1997).

Em experimento envolvendo macrófagos de medula óssea (BMDMø) de ratos “knock out” para eNOS, foram mostrados evidências na importância da enzima NOS-constitutiva (no caso eNOS) na ativação fisiopatológica destas células, as quais mostraram considerável diminuição da atividade de NF- κ B e na produção de NO após ativação induzida por LPS (CONNELLY et al., 2003).

O NF- κ B é um ativador transcricional de genes envolvidos na inflamação, sendo inativado quando ligado a proteínas citoplasmáticas I κ B. Muitos estímulos induzem a fosforilação e degradação de I κ B, e desse modo permitem ativação e translocação do NF- κ B ao núcleo celular. O NO pode aumentar ou diminuir a atividade NF- κ B dependendo de

sua concentração, do tipo celular e de co-estímulos (KOLB & KOLB-BACHOFEN, 1998; KRONCKE et al., 1998). Em cardiomiócitos, doadores de NO aumentam a atividade do NF- κ B e induzem a expressão de um gene receptivo ao NF- κ B em um modelo GMPc/PKG dependente. Nestas células, o GMPc (guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico) induz fosforilação e degradação de I κ B-alfa, e fosforilação direta de I κ B-alfa por PKG *in vitro* (SPIECKER et al., 1998).

Existem várias vias de transdução de sinais onde o NO está envolvido, importantes na regulação cardiovascular, gastrointestinal, sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), e sistema imunológico (MONCADA et al., 1991; ROMAN et al., 1997; VANUFFELEN et al., 1998; HOBBS, 1997; CONNELLY et al., 2003).

1.4. Nucleotídeos Cíclicos (GMPc e AMPc)

A enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) é um heterodímero composto de duas subunidades, uma α e outra β (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). Esta enzima é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos, age como principal receptor intracelular para óxido nítrico (NO) e promove a formação do segundo mensageiro GMPc (guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico), o qual está envolvido em inúmeras funções celulares via

interação com proteína-quinases específicas, canais iônicos e fosfodiesterases (PDEs) (HOBBS & IGNARRO, 1996; HOBBS, 1997).

O NO ativa a enzima GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferronitrosil. A ligação entre a His105 axial e o ferro, resulta num anel onde o NO liga-se na quinta posição e cria uma mudança conformacional na GCs (TRAYLOR & SHARMA, 1992). 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 Fe^{2+} (forma reduzida) ou Fe^{3+} (forma oxidada). O quinto membro do anel na GCs é um ligante axial imidazólico na posição His105 (STONE & MARLETTA, 1994). A mutação deste aminoácido, localizado próximo ao N-terminal da subunidade $\beta 1$, determina a incapacidade da GCs ligar-se ao grupo heme, resultando numa enzima insensível ao NO (WEDEL et al., 1994).

A ativação da GCs causa elevação nos níveis intracelulares de GMPc, o qual é clivado a partir do trifosfato de guanosina (GTP) pela enzima (RAPOPORT et al., 1983). Embora, sejam propostos vários mecanismos para um aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO (WALDMAN & MURAD, 1987).

Estudando o sistema NO-GCs-GMPc, pode-se identificar várias substâncias classificadas em dois grupos: os que inibem a degradação de GMPc como os inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5), entre eles o sildenafil e o zaprinast; e os que elevam os níveis de GMPc através da ativação direta da GCs, por sua vez representados pelo NO e os

compostos doadores de NO, entre eles a nitroglicerina, nitroprussiato de sódio (SNP) e o S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) (GORDGE et al., 1998; BRIONI et al., 2002).

O aumento nos 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, levando a uma proliferação seletiva de linfócitos Th1 (NIEDBALA et al., 2002). A seletividade e a participação do GMPC usado nestes processos abre ainda mais os caminhos para investigações sobre um possível papel do NO na modulação imunológica (NIEDBALA et al., 2002).

Em macrófagos murinos, foi verificado o efeito do NO derivado de eNOS na expressão de genes reguladores pro-inflamatórios devido a ativação de GCs e produção de GMPC. A deficiência de eNOS pôde ser reproduzida com inibidores de GCs usando 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 componente 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine (BAY 41-2272) (STASCH et al., 2001).

Com isso, GMPC mostra ser uma molécula mensageira chave em inúmeros processos celulares envolvidas na resposta imunológica como a diferenciação, quimiotaxia, proliferação e liberação de mediadores imunológicos (KOBIALKA & GORCZYCA, 2001).

Outro segundo mensageiro conhecido e estudado é o AMPc (adenosina-3', 5'-monofosfato cíclico), formado pela conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em AMPc por ativação da enzima adenilato ciclase (AC) diretamente ou indiretamente via ativação da proteína G acoplada ao receptor de membrana (GPCR), podendo também ser regulado pelas fosfodiesterases específicas para sua degradação.

O AMPc está envolvido em diversos mecanismos, como na ativação das proteínas quinases A, regulação de diversos processos celulares, proliferação e diferenciação, condensação e descondensação da cromatina, regulação dos mecanismos de transporte intracelular, fluxo de íons e controle de exocitose de células epiteliais polarizadas. AMPc é a primeira via intracelular a transportar sinais β -adrenérgicos no sistema cardiovascular e em tecidos adiposos. É também envolvido na regulação da esteróidogênese e funções reprodutivas assim como na modulação de respostas imunológicas (TASKEN & AANDAHL, 2004).

O tratamento de células mielomonocíticas humanas com agentes que promovem o aumento nos níveis de AMPc intracelular mostrou que este segundo mensageiro promove a diferenciação e maturação celular (SUNDSTROM & NILSSON, 1976; OLSSON & BREITMAN, 1982; OLSSON et al., 1982; CHAPLINSKI & NIEDEL, 1982; OLSSON et al., 1983; LASKIN et al., 1990; KLOS et al., 1992).

Um fator de transcrição importante na regulação de alguns genes do sistema imunológico é o CREB-1 (Cyclic AMP response element binding protein-1). O CREB-1 liga-se ao CRE, sítio no DNA cuja sequência é TGANNTCA, como homo- ou heterodímero em associação com membros da família de proteínas (ATF)³, incluindo ATF-1 e elemento modulador responsável pelo AMPc, assim como c-Jun, membro da família AP-1. (MONTMINY et al., 1986; HAI & CURRAN, 1991). Múltiplas vias de sinalização, incluindo proteína quinase A AMPc-responsiva, proteína quinase C, CaM quinases II e IV dependentes de cálcio/calmodulina, e uma quinase RSK2 Ras dependente de serina/tirosina, medeiam fosforilação e ativação de CREB-1 em diferentes tipos celulares (HAGIWARA, 1996; MUTHUSAMY & LEIDEN, 1998).

Muitas vezes o CREB-1 está envolvido na regulação negativa de alguns genes, mas foi identificado o papel diferencial do CREB-1 em múltiplos estágios do desenvolvimento das células B e maturação funcional *in vivo* (CHEN et al., 2006).

1.5. BAY-41-2272

O componente YC-1 (3-(5'-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole) foi descrito como um ativador da GCs independente de NO capaz de relaxar músculo liso *in vitro*, reduzir a pressão sanguínea *in vivo* e inibir agregação plaquetária *in vitro* (MULSCH et al., 1997; FRIEBE & KOESLING, 1998). BAY 41-2272 (5-Ciclopropil-2-{1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridin-3-il}-pirimidin-4-ilamina) e seu análogo, BAY 41-8543, são moléculas com características e mecanismo 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).

Estes estudos sugeriram a existência de um novo sítio regulatório independente de NO na GCs localizado na região cisteína 238 e cisteína 243 da subunidade- α_1 da enzima (STONE & MARLETTA, 1994; BECKER et al., 2001; STASCH et al., 2001). 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 α_1 . 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).

A atividade do BAY 41-2272 sobre a GCs é independente de NO, porém ambos apresentam sinergismo revelado pelo aumento nos níveis intracelulares de GMPc. Experimentos *in vitro* demonstraram uma potente ativação da GCs pelo BAY 41-2272 nas concentrações de 0,1 nM a 100,0 µM. Esta estimulação foi potencializada na presença de doador de NO 2-(*N,N*-dietilamina)-2-óxido diazendato (DEA/NO; 1 uM) (STASCH et al., 2001). Em estudos utilizando-se GCs 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 NO-independente, porém heme-dependente (STASCH et al., 2001). Além de elevar níveis de GMPc, BAY 41-2272 também é capaz de elevar os níveis intracelulares de AMPc, provavelmente via ativação direta ou indireta da enzima AC (adenilato ciclase), descrito em eosinófilos, e que mostraram inibição na quimiotaxia induzida por fMLP (THOMAZZI et al., 2005).

Estudos prévios mostraram que o componente original YC-1 inibiu funções diretas de neutrófilos humanos via AMPc dependente de proteína quinase A (HWANG et al., 2003). Porém, em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMø) de ratos incubados com inibidor de GCs (ODQ), BAY 41-2272 (0,1 a 30,0 uM) e LPS 100 ng/ml, demonstrou-se que a expressão de iNOS é dependente de BAY 41-2272 de forma dose dependente (GARTHWAITE et al., 1995; CONNELLY et al., 2003). O efeito potencial de geração de GMPc foi revertido pelo ODQ (10,0 uM), confirmando a importância da GCs na regulação da ativação em macrófagos. Um aumento similar na produção de GMPc foi também observado na ausência de LPS, somente na presença do BAY 41-2272 (10,0 uM) (CONNELLY et al., 2003). Na presença de inibidores de NOS, como L-NAME, o efeito máximo do YC-1 é diminuído em células endoteliais, o que indica a existência de uma ação

sinérgica sobre a GCs entre o YC-1 e o NO endógeno liberado pelas células endoteliais (WOHLFART et al., 1999). BAY 41-2272 é, portanto, uma ferramenta farmacológica diferenciada das ações do NO dependente e independente de GMPc, e efeitos dependentes de AMPc, sem seus efeitos citotóxicos, revelando um amplo potencial terapêutico. Investigamos o efeito do BAY 41-2272 sobre o sistema NADPH oxidase em células mielomonocíticas humanas, THP-1, analisando possíveis vias intracelulares envolvendo GMPc, AMPc e NO.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do BAY 41-2272 sobre o Sistema NADPH oxidase em células mielomonocíticas humanas, THP-1. Quantificando após os tratamentos:

- Liberação de Superóxido;
- Expressão da gp91-*phox*.
- Níveis intracelulares de GMPc e AMPc;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Condições de cultura celular

As células mielomonocíticas humanas da linhagem THP-1 (TSUCHIYA et al., 1980; TSUCHIYA et al., 1982; TSUCHIYA et al., 1986) foram cultivadas ($0,5$ a $1,0 \times 10^6$ células / ml) em meio completo RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF (soro bovino fetal; v / v) inativado pelo calor (56°C por 30 minutos), L-glutamina (2,0 mM), penicilina (100 U / ml) e estreptomicina ($100 \mu\text{g}$ / ml), e mantidas a 37°C em atmosfera úmida na presença de 5% CO_2 por período inferior a 30 dias, em condições livres de endotoxina (<10 pg/ml). A contagem e a viabilidade celular foram avaliadas por exclusão utilizando o corante azul de Tripiano.

3.2. Tratamentos farmacológicos

Em todos os tratamentos farmacológicos as células foram mantidas em frascos de cultura celular (75 ou 50 ml), e os fármacos diluídos na sua concentração final de acordo com o volume do meio de cultura nos frascos.

Células THP-1 incubadas com interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$; 100 U / ml) e fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$; 1000 U / ml) por 48 horas foram usados para o controle positivo dos ensaios envolvendo liberação de superóxido e expressão da *gp91-phox*. Abaixo listamos os fármacos utilizados nesta pesquisa e seus respectivos mecanismos de ação:

- ✓ ZAP (zaprinast): inibidor das fosfodiesterases 5, 6 e 9 impedindo a degradação de GMPc;
- ✓ ODQ (1*H*-[1,2,4] oxidiazolo[4,3- α] quinoxaline-1-one): inibidor da enzima GCs (guanilato ciclase);
- ✓ IBMX: inibidor inespecífico de fosfodiesterase;
- ✓ SQ 22.536 (9-(tetrahydro-2-furanyl) adenine): inibidor da enzima AC (adenilato ciclase);
- ✓ L-NAME (*N*^o-nitro-L-arginine metyl éster): inibidor inespecífico de NO-sintases;
- ✓ SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine): doador de NO;
- ✓ Forscolina (7 β -Acetoxy-1 α , 6 β , 9 α -trihydroxy-8, 13-epoxy-labd-14-en-11-one): inibidor de PDE4 também descrito como ativador da enzima AC;
- ✓ Iloprost (análogo da prostaciclina): ativador da enzima AC;

Para o ensaio de liberação de superóxido, células THP-1 foram tratadas com BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 μ M) por 48 horas com ou sem pré-incubação com Zaprinast (ZAP; 10,0 μ M) 30 minutos antes da adição do BAY 41-2272. Em outro grupo de experimentos, células THP-1 foram pré-incubadas com L-NAME (100,0 μ M), ODQ (100,0 μ M), SQ 22.536 (100,0 μ M), SNAP (100,0 μ M), Forscolina (30,0 μ M) ou Iloprost (3,0 μ M) antes da adição de BAY 41-2272 (3,0 μ M) (todas receberam ZAP 10,0 μ M 30 minutos antes).

Para o ensaio de extração e dosagem de nucleotídeos cíclicos, células THP-1 foram incubadas com inibidores de fosfodiesterases (PDEs) ZAP (10,0 μ M; específico para GMPc) ou 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX; 0,5 mM; inespecífico mas visando AMPc) por 30 minutos na cultura antes da adição de BAY 41-2272. As suspensões celulares (0,5 a

1,0 x 10⁶ células / ml) foram incubadas com BAY 41-2272 (10,0 µM) por 6, 12, 24 e 48 horas ou BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 µM) por 48 horas, pré-incubadas com os respectivos inibidores de PDEs. Em outro grupo, células THP-1 foram pré-incubadas por 10 minutos com ODQ (100,0 µM) e com ZAP (10,0 µM) antes da adição de BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 µM) durante 48 horas para dosagem de GMPc. O doador de NO, SNAP (100,0 µM), e ativadores da adenilato ciclase, Iloprost (3,0 µM) e Forscolina (30,0 µM) foram usados como controles positivos nos ensaios envolvendo GMPc e AMPc, respectivamente.

Para a extração de mRNA e realização dos ensaios de expressão gênica da *gp91-phox*, células THP-1 foram incubadas somente com BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 µM) por 48 horas, ou pré-incubadas com ZAP (10,0 µM; 30 minutos antes de adicionar BAY 41-2272), ou então pré-incubadas com IBMX (0,5 mM; 30 minutos antes de adicionar BAY 41-2272). Em outro grupo de experimentos, células foram pré-incubadas somente com ZAP (10,0 µM) ou pré-incubadas também com L-NAME (100,0 µM), ODQ (100,0 µM), SQ 22.536 (100,0 µM), SNAP (100,0 µM), Forscolina (30,0 µM) ou Iloprost (3,0 µM) antes da adição de BAY 41-2272 (3,0 µM).

3.3. Dosagem de Superóxido

A liberação de superóxido foi avaliada pela superóxido dismutase (SOD), um inibidor específico da redução do *citocromo c* (horse heart), ensaio descrito por (MCCORD & FRIDOVICH, 1969), modificado por (CONDINO-NETO et al., 1993; CONDINO-NETO et al., 1996). As células foram incubadas com phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 30,0 nM) na presença de *citocromo c* (80,0 µM) na presença ou ausência de SOD

(60 U / ml) a 37 °C durante 60 minutos. A absorbância dos sobrenadantes foi monitorada em espectrofotômetro (550 nm; DU Series 500, Beckman). As quantidades totais de superóxido liberado foram calculadas usando um coeficiente de extinção de $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nmol de superóxido liberado por 10^6 céls por hora ($\text{nmol O}_2^- / 10^6 \text{ céls} / \text{hora}$).

3.4. Extração e Dosagem de GMPc e AMPc

Após tratamentos das células THP-1, a reação foi interrompida pela adição de etanol absoluto gelado para uma concentração final de 67% (v / v), as amostras foram agitadas vigorosamente manualmente por 30 segundos. Essas amostras foram então incubadas no gelo por 30 minutos antes de centrifugar a 4000x g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e reservados, e os precipitados foram lavados com etanol acidificado (0,5 ml 67%; v / v) antes de nova centrifugação a 14000x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes destes lavados foram coletados e adicionados aos primeiros sobrenadantes, e em seguida secos em banho-maria a 55-60°C sob fluxo de nitrogênio e estocados a -20°C até o ensaio de dosagem de GMPc ou AMPc. Estes foram dosados usando os respectivos kits comerciais da Cayman, de acordo com os fabricantes (PRADELLES et al., 1989; MAXEY, 1992). Os resultados foram expressos em concentração de GMPc em fmol por ml por cada 10^6 células ($[\text{GMPc}] \text{ fmol} / \text{ml} / 10^6 \text{ céls}$).

3.5. Expressão gênica da gp91-phox

Os níveis de mRNA que codificam a gp91-phox foram determinados por análise relativa pelo ensaio de transcrição reversa seguida de reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) usando o kit QuantumRNA™ Classic II 18S kit (Ambion Inc., TX, USA). Esta técnica utiliza dois pares de oligonucleotídeos iniciadores em cada reação, um para amplificar o cDNA de interesse e outro para amplificar o controle interno (RNAr 18S). No entanto, como o controle interno é abundante, é importante que a eficiência da amplificação do controle interno (18S) esteja sendo observada na mesma intensidade da amostra alvo. Para solucionar este problema, o kit provê um limitador (competímero) que modula a eficiência da amplificação do controle interno, o qual consiste de um oligonucleotídeo modificado em seu extremo 3', que bloqueia parcialmente a extensão pela DNA polimerase, quando adicionado na reação do controle interno na devida proporção, permitindo a comparação da amplificação na mesma faixa de variabilidade linear.

O RNA total das células THP-1 foi isolado de 1×10^7 células. As células foram lavadas uma vez com Hank's 1X gelado, e o RNA total foi extraído usando um reagente comercial TRIzol® (Gibco BRL, MD, USA; 1 ml / 1×10^7 céls) e quantificado em luz ultravioleta (UV) em espectrofotômetro (260/280 nm; DU Series 500, Beckman) e estocados a -80°C até seu uso (MANIATIS, 1990). As amostras de cDNA foram sintetizadas a partir de 2 µg de RNA total usando o sistema de Transcrição Reversa com primers hexâmeros randômicos (5 µM; Amersham) em uma mistura de 20 µL contendo tampão RT (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM), dNTP's 250 µM cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen); 5 mM DTT (Invitrogen); 28,4 U de inibidor de

RNase (RNAguardTM; Amersham); e 200 U da enzima transcriptase reversa (M-MLV [*Moloney Murine Leukemia Virus*] RT; kit SuperscriptTM II Reverse Transcriptase, Invitrogen) (CONDINO-NETO & NEWBURGER, 2000). Os seguintes primers foram usados para determinar níveis de mRNA por PCR: amplificação de 415 pb de produto final, sense, 5'- CTC TAG AGC ATG AGG GGC TCT CCA TTT TTG TCA - 3' e antisense, 5'- CGG GAT CCC GAG TTC AGA GAG TGC TAC TGA ATA A - 3' (400 nM cada; gp91-*phox* 32F / 443R, Invitrogen; GenBank - código de acesso NM 000397); amplificação de 324 pb de produto final (40 nM par de primers 18S, 360 nM competímero 18S; kit da Ambion Inc). Para a reação do PCR foram usados num volume final de 25 ul os seguintes reagentes com as concentrações finais: tampão PCR (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) 250 uM de cada, oligonucleotídeos (forward e reverse) 400 nM de cada específicos para o gene em estudo e 2,5 U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) durante 30 ciclos de desnaturação (15 s; 95°C), anelamento (30 s; 63°C), e extensão (45 s; 72°C) com uma extensão de 7 minutos a 72°C após último ciclo. As reações foram corridas em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo (1 µg / ml; Gibco BRL, USA) e os produtos visualizados e analisados pelo software (ImageMaster v2.0) por iluminação UV (Imagemaster VDS, Pharmacia Biotech). A densitometria das amostras do gene alvo gp91-*phox* foram normalizadas com o controle interno, 18S, um gene de expressão constitutiva.

3.6. Materiais

BAY 41-2272 foi doado pela Pharma Research Center, Bayer AG (Wuppertal, Germany). DMSO, Forscolina, IBMX, SQ 22.536, Citocromo *c*, PMA, SOD, Brometo de Etídeo, Tripsina e RPMI 1640 foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). L-NAME, SNAP, ODQ, Zaprinast (ZAP) foram comprados da Calbiochem (Germany). TNF- α e IFN- γ recombinante humano foram comprados da R & D Systems Inc. Trizol (TRIzol®), Inibidor de Rnase (RNAguard™), Pares de primers (gp91-*phox*), Superscript™ II RT (M-MLV) e Taq polimerase foram comprados da Invitrogen. QuantumRNA™ Classic II 18S kit foram comprados da Ambion Inc. (TX, USA). Primers hexâmeros randômicos foram comprados da Amersham Biosciences (U.S.A.). Kits para dosagem de GMPc e AMPc foram comprados da Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, U.S.A.). Iloprost foi amigavelmente fornecido pela Schering (Germany).

3.7. Análise Estatística

Os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média (SEM) e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos do teste de Tukey. Foram considerados significativos valores com $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do BAY 41-2272 na liberação de superóxido pelas células THP-1

O tratamento de células THP-1 com BAY 41-2272 (10,0 μM ; $n=5$) (37°C, 5% CO_2) pré-incubadas com ZAP (10,0 μM) durante 6, 12, 24 e 48 horas causou aumento significativo na liberação de superóxido por estas células comparados aos respectivos controles (ZAP sozinho) somente no tratamento com incubação de 48 horas ($122,1 \pm 14,7\%$ $P<0,05$) (Figura 2). A incubação somente com ZAP não provocou nenhum efeito sobre a liberação de superóxido (Figura 2). Células THP-1 incubadas somente com BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 μM ; $n=5$) durante 48 horas produziram aumento significativo na liberação de superóxido nas concentrações de 0,3, 1,0 e 3,0 μM comparadas ao grupo basal ($69,7 \pm 22,1\%$ $P<0,05$; $88,6 \pm 9,0\%$ $P<0,01$ e $105,3 \pm 15,0\%$ $P<0,001$, respectivamente); porém, células pré-incubadas com ZAP (10,0 μM) e posteriormente incubadas com BAY 41-2272 durante 48 horas, liberaram quantidades significativas de superóxido nas concentrações de 3,0 e 10,0 μM ($95,6 \pm 15,2\%$ $P<0,01$ e $64,6 \pm 18,8\%$ $P<0,05$, respectivamente) comparadas aos respectivos controles (Figura 3). O doador de NO, SNAP (100,0 μM ; 48 horas) pré-incubadas com ZAP, não provocou efeito significativo sobre a liberação de superóxido (Figuras 2 e 3). O aumento na liberação de superóxido observado após tratamento das células com BAY 41-2272 (pré-incubadas com ZAP) foi prevenido por pré-tratamento (10 minutos antes da adição do BAY) com ODQ (100,0 μM) (Figura 3). Em pré-incubações das células com ODQ (100,0 μM), SNAP (100,0 μM), L-NAME (100,0 μM), SQ 22.536 (100,0 μM), Forscolina (30,0 μM) ou Iloprost (3,0 μM) e incubação com BAY 41-2272 (3,0 μM) durante 48 horas, todas pré-incubadas com ZAP (10,0 μM), elevaram normalmente a liberação de superóxido comparadas aos respectivos controles ($31,8 \pm 2,0\%$

$P < 0,05$; $54,5 \pm 4,1\%$ $P < 0,05$; $62,2 \pm 9,8\%$ $P < 0,05$; $63,3 \pm 2,1\%$ $P < 0,01$; $35,6 \pm 1,5\%$ $P < 0,05$ e $22,5 \pm 0,9\%$ $P < 0,01$, respectivamente) porém, essas drogas não causaram nenhum efeito estimulatório adicional ou inibitório na liberação de superóxido se comparadas aos tratamentos somente com BAY 41-2272 e ZAP ($45,5 \pm 3,3\%$ $P < 0,01$) (Figura 4). A associação de IFN- γ (100 U / ml) e TNF- α (1000 U / ml) no tratamento de um grupo de células em paralelo foi usado como um controle positivo do ensaio (Figuras 2, 3 e 4).

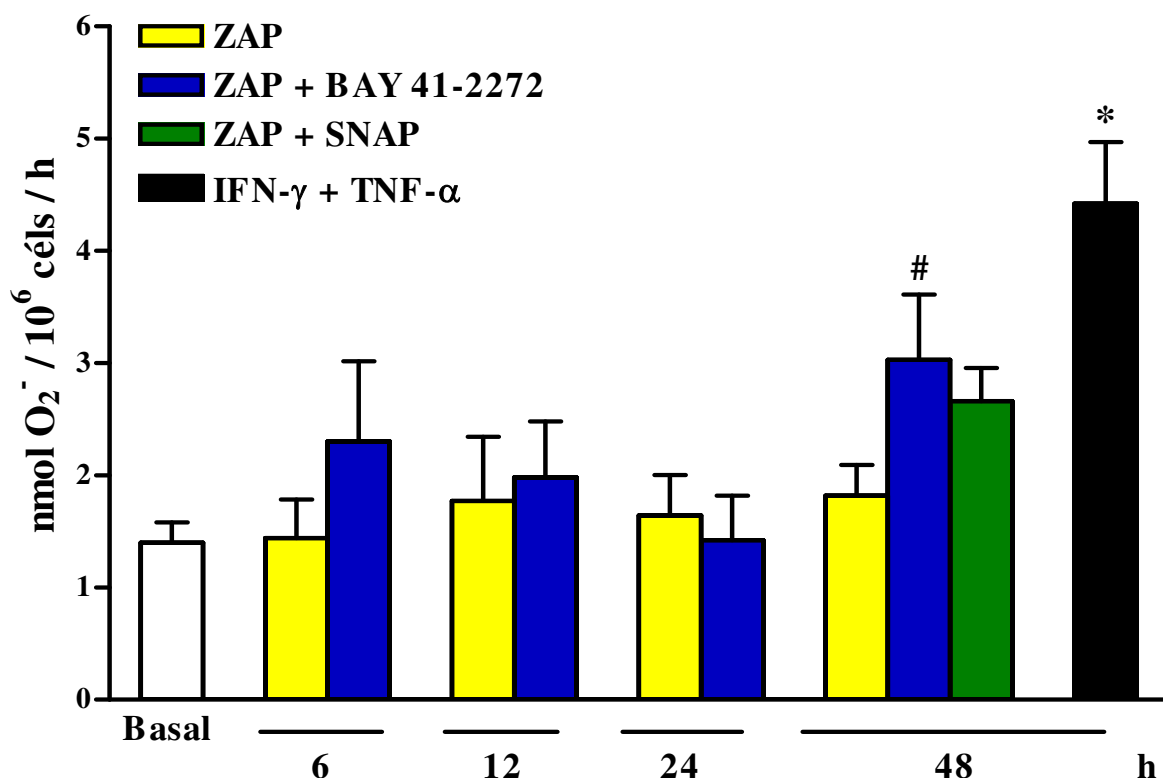


Figura 2 O efeito do BAY 41-2272 sobre a liberação de superóxido por células THP-1 após curso temporal de 6, 12, 24 ou 48 horas de incubação. As suspensões celulares (1×10^6 células / ml) foram incubadas com BAY 41-2272 na concentração de $10,0 \mu\text{M}$, pré-incubadas com ZAP ($10,0 \mu\text{M}$; colunas azuis). As colunas amarelas representam células incubadas somente com ZAP, e a coluna branca representa as células sem nenhum tratamento, grupo basal. O tratamento com SNAP ($100,0 \mu\text{M}$; 48 horas) e pré-incubação com ZAP está representado pela coluna verde. A associação de IFN- γ (100 U / ml) e TNF- α (1000 U / ml) durante 48 h, esta representado pela coluna preta. Os resultados são expressos em $\text{nmol O}_2^- / 10^6$ células / hora, apresentados como média $\pm$ erro padrão médio. * $P < 0,001$ comparado ao grupo basal; # $P < 0,05$ comparado ao respectivo controle (zaprinast sozinho) ($n=5$).

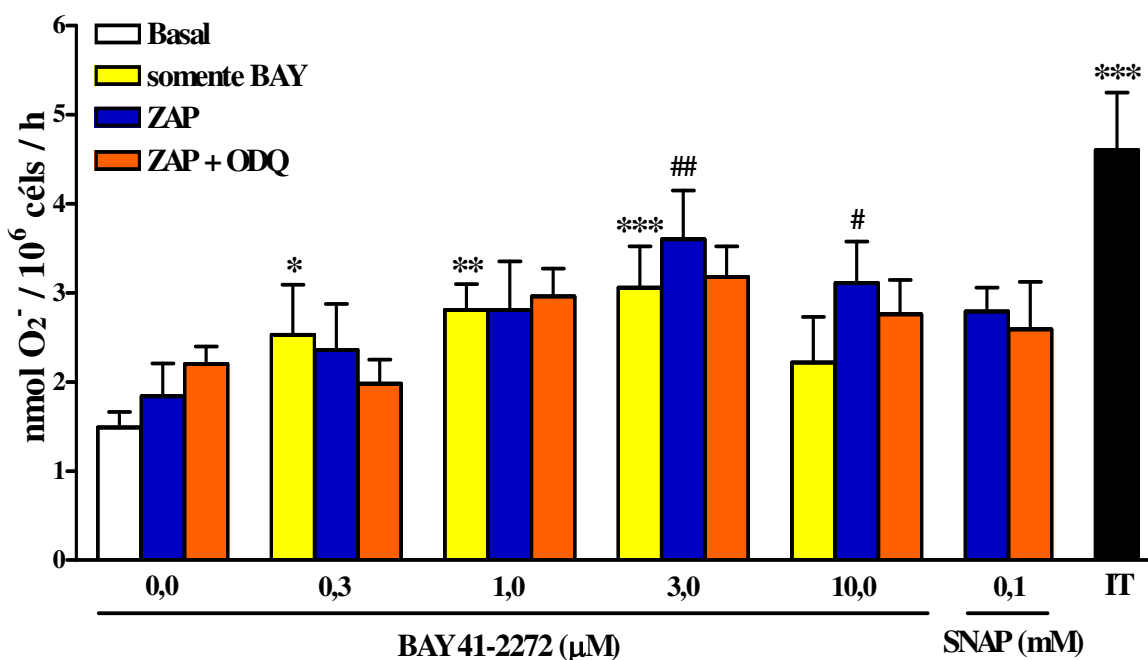


Figura 3 O efeito do BAY 41-2272 sobre a liberação de superóxido por células THP-1 após 48 horas de incubação. As suspensões celulares (1×10^6 células / ml) foram incubadas somente com BAY 41-2272 nas concentrações de 0,3 a 10,0 μ M, na ausência de ZAP e ODQ (colunas amarelas), com BAY 41-2272 ou SNAP (100,0 μ M) pré-incubadas com ZAP (10,0 μ M; colunas azuis) ou pré-incubadas com ODQ (100,0 μ M) mais BAY 41-2272 ou SNAP, também pré-incubadas com ZAP, são representados por colunas laranjas, e células sem BAY 41-2272 ou SNAP são representados pelos controles. A associação de IFN- γ (100 U / ml) e TNF- α (1000 / U) durante 48 horas, esta representado pela coluna preta. Os resultados são expressos em nmol O_2^- / 10^6 céls / hora, apresentados como média $\pm$ erro padrão médio. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao grupo basal; # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ comparados ao respectivo controle (zaprinast sozinho). ($n=5$).

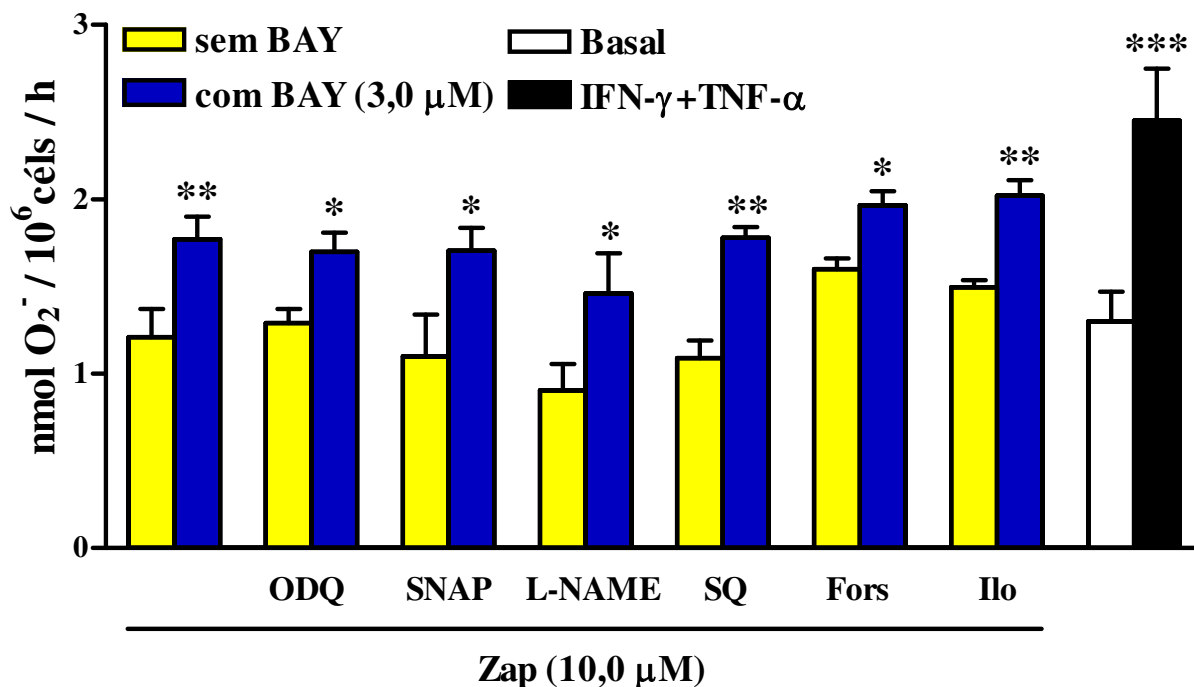


Figura 4 Efeito do BAY 41-2272 em associação com ODQ (100,0 μM), SNAP (100,0 μM), L-NAME (100,0 μM), SQ 22.536 (100,0 μM), Forscolina (30,0 μM) e Iloprost (3,0 μM) sobre a liberação de superóxido por células THP-1 após 48 horas de incubação. As suspensões celulares (1 x 10⁶ células / ml) foram incubadas com BAY 41-2272 (3,0 μM) e pré-incubadas com as respectivas drogas, todas pré-incubadas com ZAP (10,0 μM; colunas azuis), as colunas amarelas representam células sem tratamento com BAY 41-2272. A associação de IFN-γ (100 U / ml) e TNF-α (1000 / U) durante 48 horas, esta representada pela coluna preta. Os resultados são expressos em nmol O₂⁻ / 10⁶ células / hora, apresentados como média ± erro padrão médio. **P*<0,05, ***P*<0,01 comparados aos respectivos controles (ZAP e respectivas drogas); ****P*<0,001 comparado ao grupo basal. (*n*=5)

4.2. Efeito do BAY 41-2272 na expressão da gp91-phox em células THP-1

O tratamento de células THP-1 incubadas somente com BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 μ M; $n=3$) durante 48 horas provocou aumento significativo na expressão da gp91-phox somente na concentração de 3,0 μ M ($73,0 \pm 3,5\%$ $P<0,01$) comparado ao grupo basal. Células pré-incubadas com ZAP (10,0 μ M; 30 minutos antes da adição de BAY) e posterior incubação com BAY 41-2272 durante 48 horas, provocaram aumento significativo na expressão da gp91-phox nas concentrações de 1,0, 3,0 e 10,0 μ M ($181,4 \pm 21,4\%$ $P<0,05$; $257,0 \pm 43,5\%$ $P<0,01$ e $214,6 \pm 30,9\%$ $P<0,05$, respectivamente) comparadas ao controle (ZAP sozinho), e células pré-incubadas com IBMX (0,5 mM; 30 minutos antes da adição de BAY) e posterior incubação com BAY 41-2272 provocaram aumento significativo na expressão da gp91-phox somente na concentração de 3,0 μ M ($55,8 \pm 0,6\%$ $P<0,01$) comparadas ao controle (IBMX sozinho) (Figura 5). Em pré-incubações com ODQ (100,0 μ M), SNAP (100,0 μ M), L-NAME (100,0 μ M), SQ 22.536 (100,0 μ M), Forscolina (30,0 μ M) ou Iloprost (3,0 μ M) e incubação com BAY 41-2272 (3,0 μ M) durante 48 horas não causaram nenhum efeito adicional na expressão do gene. Porém, nas incubações sem BAY 41-2272, somente com SNAP (100,0 μ M), houve diminuição significativa da expressão da gp91-phox ($148,3 \pm 8,9\%$ $P<0,01$), enquanto que Forscolina e Iloprost, também com pré-incubação com ZAP, (sem BAY 41-2272) provocaram aumento significativo na expressão do gene ($83,9 \pm 12,2\%$ $P<0,01$ e $62,4 \pm 9,2\%$ $P<0,01$, respectivamente) representados na Figura 6. A associação de IFN- γ (100 U / ml) e TNF- α (1000 U / ml) no tratamento de um

grupo de células em paralelo foi usado aqui novamente como um controle positivo do ensaio ($P<0,001$) (Figuras 5 e 6).

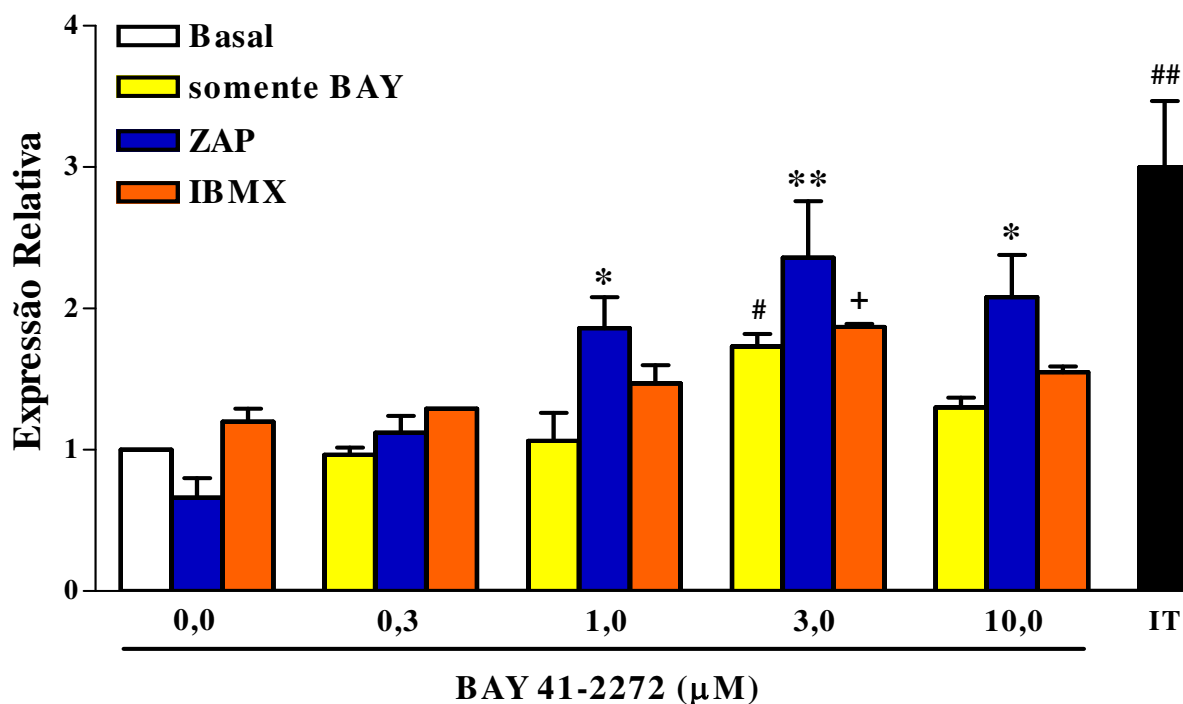


Figura 5 Efeito do BAY 41-2272 na expressão da gp91-*phox* em células THP-1. As quais foram incubadas durante 48 horas somente com BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 μM; colunas amarelas) ou pré-incubadas com Zaprinas (ZAP; 10,0 μM; colunas azuis), ou pré-incubadas com IBMX (0,5 mM; colunas laranjas). A associação de IFN-γ (100 U / ml) e TNF-α (1000 / U) durante 48 horas, esta representada pela coluna preta. A expressão relativa do gene da gp91-*phox* é apresentada como média ± erro padrão. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparados ao respectivo controle (ZAP sozinho); # $P < 0,01$ e ## $P < 0,001$ comparados ao grupo basal; + $P < 0,01$ comparado ao respectivo controle (IBMX sozinho) ($n=3$).

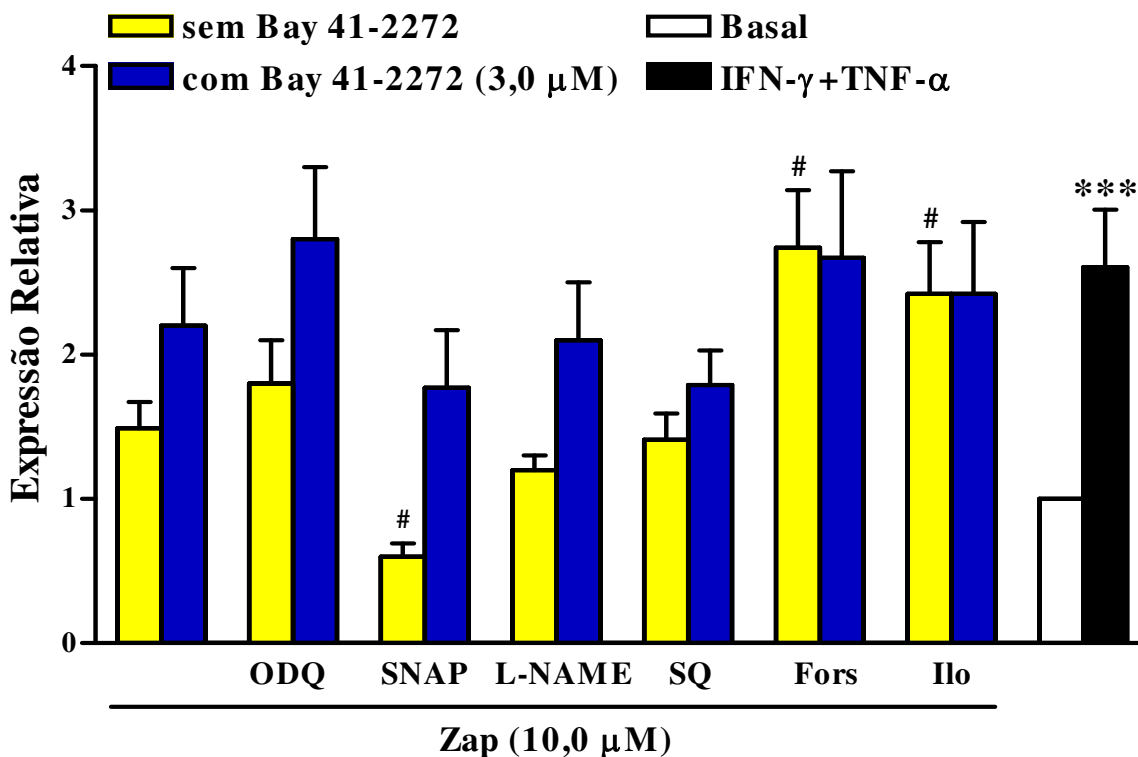


Figura 6 Efeito do BAY 41-2272 em associação com ODQ (100,0 μM), SNAP (100,0 μM), L-NAME (100,0 μM), SQ 22.536 (100,0 μM), Forscolina (30,0 μM) e Iloprost (3,0 μM) na expressão da gp91-*phox* por células THP-1 após 48 horas de incubação. As suspensões celulares (1×10^6 células / ml) foram tratadas com BAY 41-2272 (3,0 μM) incubadas com as respectivas drogas e todas pré-incubadas com ZAP (10,0 μM; colunas azuis), e as colunas amarelas representam células sem o tratamento com BAY 41-2272. Células sem nenhum tratamento são representadas pelo grupo basal (coluna branca). A associação de IFN-γ (100 U / ml) e TNF-α (1000 / U) durante 48 horas, esta representada pela coluna sólida. A expressão relativa do gene da gp91-*phox* é apresentada como média ± erro padrão. [#] $P < 0,01$ comparados ao respectivo controle (ZAP sozinho); ^{***} $P < 0,001$ comparado ao grupo basal. ($n=4$).

4.3. Efeito do BAY 41-2272 nos níveis intracelulares de GMPc e AMPc em células THP-1

Células THP-1 foram inicialmente pré-incubadas com ZAP (10,0 μ M) e então incubadas com BAY 41-2272 (10,0 μ M; $n=3$ em triplicata) durante 6, 12, 24 e 48 horas. A Figura 7 mostra que BAY 41-2272 provoca aumento significativo nos níveis intracelulares de GMPc comparado ao respectivo controle (ZAP sozinho) em todos os tempos de incubação (6, 12, 24 e 48 horas; $345,1 \pm 16,1\%$ $P<0,001$; $556,5 \pm 36,8\%$ $P<0,001$; $273,4 \pm 13,4\%$ $P<0,001$ e $231,1 \pm 41,2\%$ $P<0,001$, respectivamente). A incubação das células somente com ZAP não provocou nenhum efeito significativo sobre os níveis intracelulares de GMPc em todos os tempos (Figura 7). Células THP-1 pré-incubadas com ZAP e posteriormente incubadas com BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 μ M; $n=3$) durante 48 horas provocaram aumento significativo nos níveis intracelulares de GMPc somente nas concentrações de 3,0 e 10,0 μ M ($74,57 \pm 9,4\%$ $P<0,05$ e $284,7 \pm 25,0\%$ $P<0,01$, respectivamente) comparadas ao controle (ZAP sozinho) (Figura 8). Nas células pré-incubadas com IBMX (0,5 mM) houve um aumento significativo nos níveis intracelulares de AMPc em todas as concentrações de BAY 41-2272 (0,3, 1,0, 3,0 e 10,0 μ M; $47,9 \pm 1,8\%$ $P<0,01$; $40,2 \pm 2,1\%$ $P<0,05$; $49,1 \pm 2,2\%$ $P<0,01$ e $58,5 \pm 4,7\%$ $P<0,001$, respectivamente) comparados ao controle (IBMX sozinho) (Figura 9). O pré-tratamento (10 minutos antes da adição de BAY) com ODQ (100,0 μ M) previniu o aumento nos níveis de GMPc observado após tratamento com BAY 41-2272 (0,3, 1,0 3,0 e 10,0 μ M) ($343,7 \pm 0,04\%$ $P<0,001$; $153,1 \pm 1,9\%$ $P<0,001$; $83,9 \pm 1,6\%$ $P<0,001$ e $49,3 \pm 2,6\%$ $P<0,01$, respectivamente) e SNAP ($204,0 \pm 3,5\%$ $P<0,001$) (Figura 8). O doador de NO, SNAP

(100,0 μM), foi usado como um controle positivo, e mostrou ser capaz de aumentar os níveis intracelulares de GMPc após 48 horas de tratamento (Figuras 7 e 8; $P<0.001$ e $P<0.01$, respectivamente). Forscolina (30,0 μM) e Iloprost (3,0 μM), foi usado como um controle positivo e mostrou ser capaz de promover o aumento dos níveis intracelulares de AMPc após 48 horas de tratamento ($30,0 \pm 1,0\%$ $P<0,01$ e $29,2 \pm 1,4\%$ $P<0,01$, respectivamente) (Figura 9).

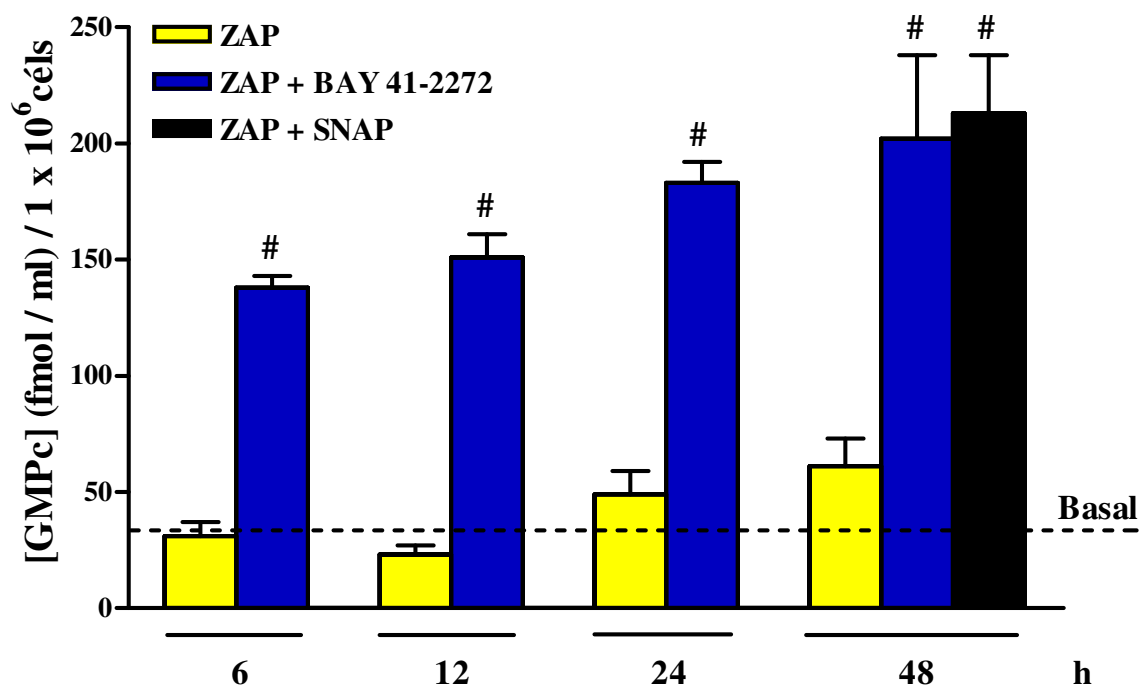


Figura 7 Efeito do BAY 41-2272 (10,0 μ M) sobre os níveis intracelulares de GMPC em células THP-1 após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação. As suspensões celulares (1×10^6 células / ml) foram incubadas com BAY 41-2272 (10,0 μ M) e pré-incubadas com ZAP (10,0 μ M; colunas azuis). Colunas amarelas representam células incubadas somente com ZAP. O controle positivo é representado pelas células incubadas com SNAP (100,0 μ M; 48 horas) pré-incubadas com ZAP, e esta representado pela coluna preta. Os níveis intracelulares de GMPC estão expressos em [GMPC] fmol / ml / 1×10^6 células, e apresentados como média $\pm$ erro padrão. # $P < 0,001$ comparado aos respectivos controles (ZAP sozinho) ($n=6$).

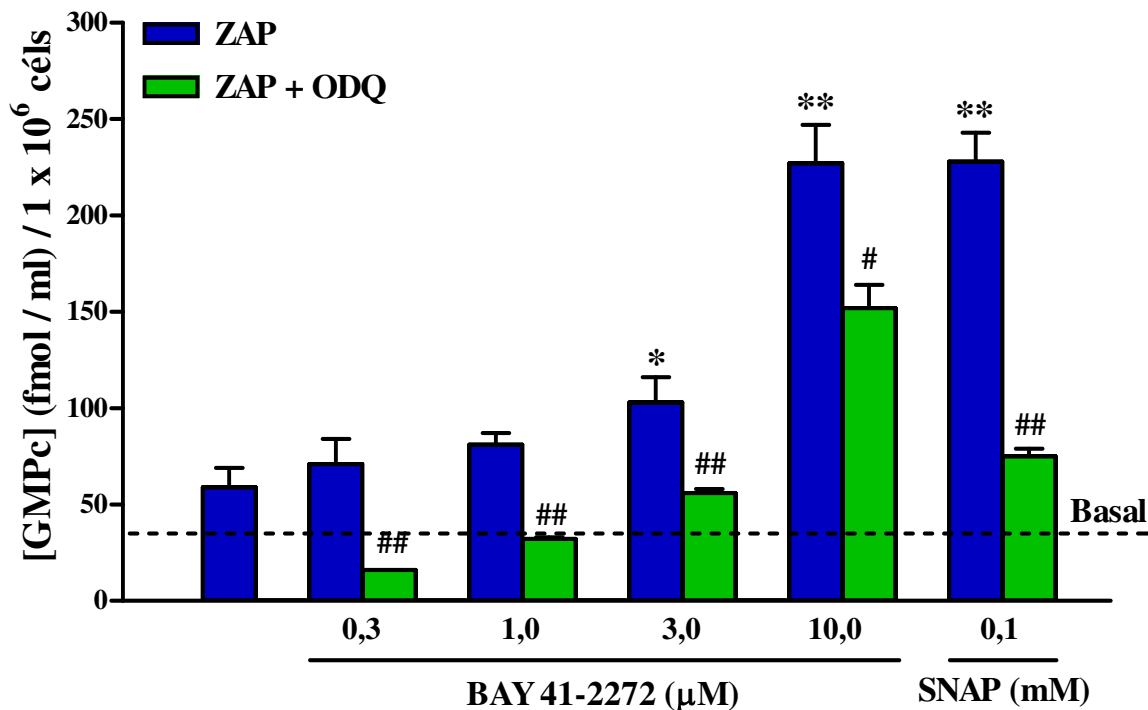


Figura 8 Efeito do BAY 41-2272 sobre os níveis intracelulares de GMPc em células THP-1 após 48 horas de incubação. As suspensões celulares (1×10^6 células / ml) foram incubadas com BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 μ M) ou SNAP (100,0 μ M) pré-incubadas com ZAP (10,0 μ M; colunas azuis) ou em associação com ODQ (100,0 μ M; 10 minutos antes da adição de BAY; colunas verdes). Células incubadas somente com ZAP é representado como grupo controle, e células sem nenhum tratamento são representadas pelo grupo basal (coluna branca). Os níveis intracelulares de GMPc estão expressos em [GMPc] fmol / ml / 1×10^6 células, e apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparados ao respectivo controle (ZAP sozinho); # $P < 0,01$, ## $P < 0,001$ comparados aos respectivos controles ($n=6$).

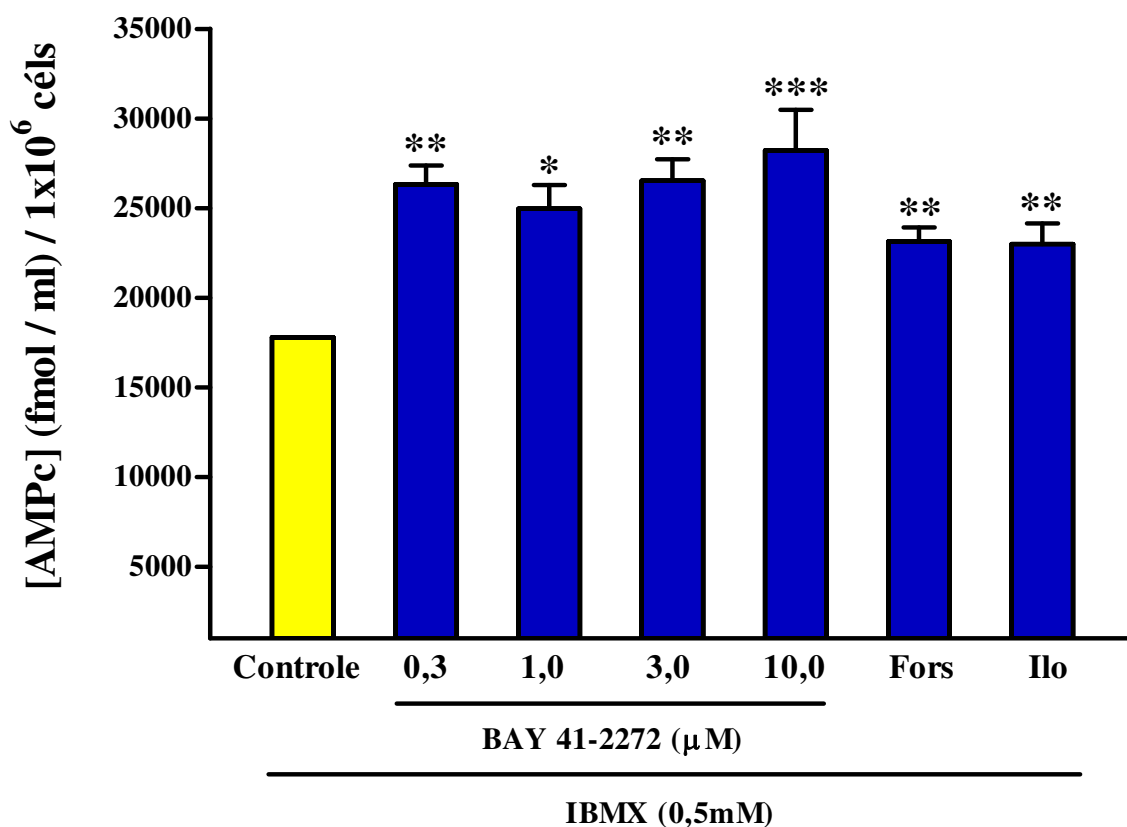


Figura 9 Efeito do BAY 41-2272 (10,0 μM) sobre os níveis intracelulares de AMPc em células THP-1 após 48 horas de incubação. As suspensões celulares (1×10^6 células / ml) foram incubadas com BAY 41-2272 (0,3 a 10,0 μM), Forscolina (30,0 μM) ou Iloprost (3,0 μM) pré-incubadas com IBMX (0,5 mM) são representadas pelas colunas azuis. Células incubadas somente com IBMX são representadas pelo grupo controle (coluna amarela). Os níveis intracelulares de GMPc estão expressos em [GMPc] fmol / ml / 1×10^6 células, e apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparados ao controle (IBMX sozinho) ($n=4$)

5. DISCUSSÃO

Demonstramos neste estudo que BAY 41-2272 exibe um efeito estimulatório na liberação de superóxido e na expressão da *gp91-phox* em células THP-1, o qual foi acompanhado por aumento significativo nos níveis intracelulares de GMPc e AMPc.

Sabemos que o NO se liga ao grupo heme da GCs, ativando a enzima e catalisando a conversão de GTP a GMPc (LUCAS et al., 2000). Em plaquetas humanas, SNAP provocou a produção de altos níveis de GMPc comparado ao SNP, ambos são capazes de liberar grandes quantidades de NO (GORDGE et al., 1998). Também foi demonstrado, contrastando nossos resultados, que NO é um potente inibidor da expressão de NADPH oxidase, um efeito mediado por mecanismo dependente de GMPc (MUZAFFAR et al., 2004). O doador clássico de NO, S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) libera NO por mecanismos altamente dependentes de determinados componentes de um sistema, por exemplo, a concentração de tiol reduzido e metais de transição. (DICKS & WILLIAMS, 1996; SINGH & SOMMER, 1996).

Em experimentos envolvendo migração de neutrófilos induzida por azida, sugere-se que essa migração seja mediada via GMPc e proteína-quinases dependentes de GMPc, pois é reduzida na presença de inibidores de GMPc e de proteína-quinases GMPc-dependentes (VANUFFELEN et al., 1998).

Estudos utilizando Angeli's salt (AS), mostraram aumento dos níveis de GMPc intracelular (VANUFFELEN et al., 1998). O papel do GMPc na migração de neutrófilos induzida por NO e AS foi investigado usando um número de inibidores da via de transdução de sinal do GMPc e novamente foi reduzida por esse tratamento. Estes resultados deixam claro que a ativação de GCs, e subsequente aumento dos níveis de GMPc e ativação das proteína-quinases GMPc-dependente estão envolvidos na acentuação da migração de neutrófilos (VANUFFELEN et al., 1998).

Embora não seja um doador de NO, BAY 41-2272 gera quantidades significativas de GMPc, pois ativa a enzima GCs através de um sítio distinto daquele utilizado pelo NO (BECKER et al., 2001; STASCH et al., 2001; STRAUB et al., 2001; STASCH et al., 2002). Por outro lado, um recente estudo demonstrou que os efeitos do BAY 41-2272 sobre plaquetas humanas são devido ao sinergismo de sensibilização da GCs NO-sensível e inibição de PDE-5 (MULLERSHAUSEN et al., 2004), mas é contrariado em outro estudo, também com plaquetas (BISCHOFF & STASCH, 2004). BAY 41-2272 mostrou ser um potente vasodilatador *in vitro* de anéis aórticos e da artéria safena de coelhos (STASCH et al., 2001; STRAUB et al., 2001; STRAUB et al., 2002), corpos cavernosos de humanos e coelhos (BARACAT et al., 2003; BISCHOFF et al., 2003; KALSI et al., 2003), e músculo liso de parede vaginal e clitoral de coelhos (CELLEK, 2003). Além disso, este componente reduz a pressão arterial média em ratos normotensos e hipertensos, tem atividade antiplaquetária *in vitro* e prolonga o tempo de sangramento em cauda de ratos (STASCH et al., 2001; STRAUB et al., 2001; STRAUB et al., 2002; HOBBS & MONCADA, 2003). Em modelos de cães com falha congestiva do coração, BAY 41-2272 aumentou a produção cardíaca e preservou a filtração glomerular sem ativar o sistema renina-angiotensina-aldosterona (BOERRIGTER et al., 2003). Todos estes efeitos do BAY 41-2272 são atribuídos a estimulação da enzima GCs independente de NO e sensibilização da GCs por NO endógeno.

O componente ODQ inibe a atividade de GCs estimulada pelo NO (GARTHWAITE et al., 1995) e tem sido extensivamente usado para estudar a função da via de transdução NO-GMPc. O efeito inibitório de ODQ sobre GCs estimulado por NO é devido a mudanças no estado de oxidação de heme, sem afetar a atividade catalítica da enzima (ZHAO et al., 2000). Em experimentos realizados com BAY 41-2272, o ODQ falhou na redução do

estímulo da enzima GCs purificada (STASCH et al., 2001), e sozinho reduziu parcialmente o relaxamento de corpos cavernosos induzido pelo BAY 41-2272 (BARACAT et al., 2003). Porém, em nossos estudos em células THP-1, o aumento nos níveis de GMPc induzido pelo BAY 41-2272 (0,3 a 3,0 μ M) foi altamente prevenido por pré-incubação com ODQ (100,0 μ M) e parcialmente no tratamento com BAY 41-2272 a 10,0 μ M, mas falhou na inibição da liberação de superóxido e expressão da gp91-*phox* induzido por BAY 41-2272. Baseado nas observações que ODQ e YC-1 (componente original do BAY 41-2272) ligam-se a GCs levando a uma perturbação conformacional na estrutura secundária da enzima (KOSARIKOV et al., 2001), sugerimos que em células THP-1, ao lado da oxidação de heme da GCs, ODQ tem um mecanismo alostérico por interferir na ligação de BAY 41-2272.

Elevação nos níveis intracelulares de AMPc pode ser obtido por ativação direta da enzima adenilato ciclase (AC) ou indiretamente via receptores de proteínas G acoplados a membrana, assim como prevenindo a hidrólise de AMPc pelas fosfodiesterases (EZEAMUZIE, 2001). Prostaglandina I₂ ou prostaglandina E₂ aumenta níveis de AMPc e suprimem a quimiotaxia de eosinófilos humanos (TENOR et al., 1996). Além disso, inibidores de PDE4 como o rolipram e Ro 20-1724 reduziram *in vitro* a quimitaxia de eosinófilos estimulados (ALVES et al., 1997) e *in vivo* infiltração de eosinófilos vias-aéreas por desafio, expostos ao PAF ou IL-5 (LAGENTE et al., 1994a; LAGENTE et al., 1994b). Um recente estudo mostrou que YC-1 inibiu funções de neutrófilos humanos (geração de superóxido, liberação de β -glucuronidase e p47-*phox* associado à membrana) e acelerou a ressequestração do cálcio citosólico em células humanas ativadas com fMLP por ativação direta da AMPc / proteína quinase A via independente de GMPc (HWANG et al., 2003).

Em nosso estudo, BAY 41-2272 provocou aumento significativo nos níveis intracelulares de AMPc em células THP-1 em incubações por 48h. O tratamento de U-937, uma linhagem celular derivada de fluido pleural de um paciente com linfoma histiocítico difuso, células mielomonocíticas (SUNDSTROM & NILSSON, 1976), com agentes que elevam níveis intracelulares AMPc como dB-cAMP, prostaglandina E₂, ou cólera toxina foi demonstrado provocar diferenciação celular (OLSSON & BREITMAN, 1982; OLSSON et al., 1982; OLSSON et al., 1983). Isto sugere que reações de fosforilação dependente de AMPc podem modular a diferenciação de células mielóides humanas. Em outro estudo, dB-AMPc nas concentrações de 250-500µM rapidamente induziu diferenciação de células U-937 com evidência de alterações morfológicas, expressão de receptores e respostas funcionais de células granulocíticas (LASKIN et al., 1990). Foi reportado a expressão de um receptor C3a específico em células U-937 diferenciadas com dB-AMPc, uma linhagem celular humana mostrando muitas características de um monócito imaturo (KLOS et al., 1992). É possível que a diferenciação associado com elevados níveis de AMPc seja vinculada ao desenvolvimento da linhagem granulocítica.

Portanto é plausível que AMPc antes que GMPc tenha um maior papel no efeito estimulatório de BAY 41-2272 na liberação de superóxido e expressão da gp91-*phox* em células mielomonocíticas humanas, THP-1. Mesmo assim, AMPc e GMPc gerados pelo BAY 41-2272 não afastam a possibilidade de ocorrer ao estimular o sistema NADPH oxidase em células THP-1. Por outro lado, um sinergismo entre AMPc e GMPc leva a uma inibição celular máxima reportado em plaquetas de coelho *in vitro* (LIDBURY et al., 1989).

Podemos citar também como possível colaborador para os achados deste trabalho, o fator de transcrição CREB-1 (Cyclic AMP response element binding protein-1), importante

na regulação de alguns genes do sistema imunológico. CREB-1 liga-se ao CRE, um sítio localizado no DNA (geralmente regiões promotoras) composto da sequência TGANNTCA como homo- ou heterodímero em associação com membros da família de proteínas (ATF)³, incluindo ATF-1 e elemento modulador responsável pelo AMPc, assim como membro da família AP-1 como c-Jun (MONTMINY et al., 1986; HAI & CURRAN, 1991). Múltiplas vias de sinalização, incluindo proteína quinase A AMPc-responsiva, proteína quinase C, CaM quinases II e IV dependentes de cálcio/calmodulina, e uma quinase RSK2 Ras dependente de serina/tirosina, medeiam fosforilação e ativação de CREB-1 em diferentes tipos celulares (HAGIWARA, 1996; MUTHUSAMY & LEIDEN, 1998).

Por outro lado, CREB-1 é descrito muitas vezes na regulação negativa de alguns genes, como no estudo com macrófagos inibindo expressão de Akt e proliferação celular, mas foi identificado o papel diferencial, com regulação gênica positiva, do CREB-1 em múltiplos estágios do desenvolvimento das células B e maturação funcional in vivo (CHEN et al., 2006), permanecendo obscuro os mecanismos pela qual BAY 41-2272 atua na ativação do sistema NADPH oxidase observados em neste estudo.

6. CONCLUSÕES

BAY 41-2272 estimula a liberação de superóxido, aumenta a expressão da gp91-*phox*, um dos componentes principais do sistema NADPH oxidase e eleva os níveis intracelulares de GMPc e AMPc em células de linhagem mielomonocítica humana, THP-1, comportando-se como estímulo pró-inflamatório quando ofertado cronicamente;

Drogas associadas ao BAY 41-2272 como, ODQ(100,0 μ M) , SQ 22.536 (100,0 μ M), L-NAME (100,0 μ M) e SNAP (100,0 μ M) não provocaram nenhum efeito adicional ou inibitório na liberação de superóxido, porém, L-NAME e SNAP sem a presença de BAY 41-2272, inibiram a expressão da gp91-*phox*. Adicionalmente, Forscolina (30,0 μ M) e Iloprost (3,0 μ M) provocaram aumento na expressão da gp91-*phox*, mesmo sem a presença de BAY 41-2272.

O significado desses achados com relação aos mecanismos de defesa contra infecções encontra-se em investigação em nosso laboratório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, 6: 420-4, 1999

ALVES, A. C.; PIRES, A. L.; LAGENTE, V.; CORDEIRO, R. S.; MARTINS, M. A.; E SILVA, P. M. Effect of selective phosphodiesterase inhibitors on the rat eosinophil chemotactic response in vitro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92 Suppl 2: 201-4, 1997

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol**, 16: 42-7, 2004

BARACAT, J. S.; TEIXEIRA, C. E.; OKUYAMA, C. E.; PRIVIERO, F. B.; FARO, R.; ANTUNES, E. ,et al. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. **Eur J Pharmacol**, 477: 163-9, 2003

BECKER, E. M.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; GERZER, R.; MINUTH, T.; PLEISS, U. ,et al. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. **BMC Pharmacol**, 1: 13, 2001

BERENDES, H.; BRIDGES, R. A.; GOOD, R. A. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. **Minn Med**, 40: 309-12, 1957

BISCHOFF, E.; SCHRAMM, M.; STRAUB, A.; FEURER, A.; STASCH, J. P. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylyl cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection in vivo. **Urology**, 61: 464-7, 2003

BISCHOFF, E.; STASCH, J. P. Effects of the sGC stimulator BAY 41-2272 are not mediated by phosphodiesterase 5 inhibition. **Circulation**, 110/12: 320-1, 2004

BOERRIGTER, G.; COSTELLO-BOERRIGTER, L. C.; CATALIOTTI, A.; TSURUDA, T.; HARTY, G. J.; LAPP, H. ,et al. Cardiorenal and humoral properties of a novel direct

soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. **Circulation**, 107: 686-9, 2003

BRANDES, R. P.; KREUZER, J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. **Cardiovasc Res**, 65: 16-27, 2005

BRIDGES, R. A.; BERENDES, H.; GOOD, R. A. A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. **AMA J Dis Child**, 97: 387-408, 1959

BRIONI, J. D.; NAKANE, M.; HSIEH, G. C.; MORELAND, R. B.; KOLASA, T.; SULLIVAN, J. P. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. **Int J Impot Res**, 14: 8-14, 2002

BUECHLER, W. A.; NAKANE, M.; MURAD, F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. **Biochem Biophys Res Commun**, 174: 351-7, 1991

BURG, N. D.; PILLINGER, M. H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clin Immunol**, 99: 7-17, 2001

CELLEK, S. The Rho-kinase inhibitor Y-27632 and the soluble guanylyl cyclase activator BAY41-2272 relax rabbit vaginal wall and clitoral corpus cavernosum. **Br J Pharmacol**, 138: 287-90, 2003

CHAKRAVORTTY, D.; KATO, Y.; SUGIYAMA, T.; KOIDE, N.; MU, M. M.; YOSHIDA, T. ,et al. 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**, 69: 1315-21, 2001

CHAN, E. D.; CHAN, J.; SCHLUGER, N. W. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 25: 606-12, 2001

CHAPLINSKI, T. J.; NIEDEL, J. E. Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. **J Clin Invest**, 70: 953-64, 1982

CHEN, H. C.; BYRD, J. C.; MUTHUSAMY, N. Differential role for cyclic AMP response element binding protein-1 in multiple stages of B cell development, differentiation, and survival. **J Immunol**, 176: 2208-18, 2006

CLARK, R. A.; MALECH, H. L.; GALLIN, J. I.; NUNOI, H.; VOLPP, B. D.; PEARSON, D. W. ,et al. Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. **N Engl J Med**, 321: 647-52, 1989

CONDINO-NETO, A.; MUSCARA, M. N.; BELLINATI-PIRES, R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; BRANDAO, A. C.; GRUMACH, A. S. ,et al. 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**, 16: 357-64, 1996

CONDINO-NETO, A.; MUSCARA, M. N.; GRUMACH, A. S.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; DE NUCCI, G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. **Br J Clin Pharmacol**, 35: 485-90, 1993

CONDINO-NETO, A.; NEWBURGER, P. E. 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**, 95: 3548-54, 2000

CONNELLY, L.; JACOBS, A. T.; PALACIOS-CALLENDER, M.; MONCADA, S.; HOBBS, A. J. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. **J Biol Chem**, 278: 26480-7, 2003

DICKS, A. P.; WILLIAMS, D. L. Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein-bound Cu²⁺ sources. **Chem Biol**, 3: 655-9, 1996

DINAUER, M. C.; ORKIN, S. H.; BROWN, R.; JESAITIS, A. J.; PARKOS, C. A. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. **Nature**, 327: 717-20, 1987

DINAUER, M. C.; PIERCE, E. A.; BRUNS, G. A.; CURNUTTE, J. T.; ORKIN, S. H. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. **J Clin Invest**, 86: 1729-37, 1990

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 53: 199-206, 2005

EZEAMUZIE, C. I. Requirement of additional adenylate cyclase activation for the inhibition of human eosinophil degranulation by phosphodiesterase IV inhibitors. **Eur J Pharmacol**, 417: 11-8, 2001

FRIEBE, A.; KOESLING, D. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. **Mol Pharmacol**, 53: 123-7, 1998

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; 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**, 48: 184-8, 1995

GERZER, R.; RADANY, E. W.; GARBERS, D. L. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. **Biochem Biophys Res Commun**, 108: 678-86, 1982

GORDGE, M. P.; HOTHERSALL, J. S.; NORONHA-DUTRA, A. A. Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. **Br J Pharmacol**, 124: 141-8, 1998

HAGIWARA, M. [Transcriptional regulation by cAMP and calcium]. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, 107: 47-52, 1996

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**, 88: 3720-4, 1991

HARTENECK, C.; KOESLING, D.; SOLING, A.; SCHULTZ, G.; BOHME, E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. **FEBS Lett**, 272: 221-3, 1990

HOBBS, A. J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends Pharmacol Sci**, 18: 484-91, 1997

HOBBS, A. J.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. **Methods Enzymol**, 269: 134-48, 1996

HOBBS, A. J.; MONCADA, S. Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272. **Vascul Pharmacol**, 40: 149-54, 2003

HOLMES, B.; PAGE, A. R.; GOOD, R. A. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. **J Clin Invest**, 46: 1422-32, 1967

HOLMES, B.; QUIE, P. G.; WINDHORST, D. B.; GOOD, R. A. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. **Lancet**, 1: 1225-8, 1966

HWANG, T. L.; HUNG, H. W.; KAO, S. H.; TENG, C. M.; WU, C. C.; CHENG, S. J. Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 inhibits human neutrophil functions through a cGMP-independent but cAMP-dependent pathway. **Mol Pharmacol**, 64: 1419-27, 2003

IGNARRO, L. J.; DEGNAN, J. N.; BARICOS, W. H.; KADOWITZ, P. J.; WOLIN, M. S. 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: 49-59, 1982

IWANAMI, M.; TAKEDA, K.; IWAMOTO, S.; KONNO, K. Combination effects of interferon-gamma and cholera toxin on induction of differentiation of an insensitive U-937 clone. **Jpn J Cancer Res**, 81: 520-6, 1990

KALSI, J. S.; REES, R. W.; HOBBS, A. J.; ROYLE, M.; KELL, P. D.; RALPH, D. J., et al. BAY41-2272, a novel nitric oxide independent soluble guanylate cyclase activator, relaxes human and rabbit corpus cavernosum in vitro. **J Urol**, 169: 761-6, 2003

KLOS, C.; KOOB, M.; KRAMER, C.; DEKANT, W. p-aminophenol nephrotoxicity: biosynthesis of toxic glutathione conjugates. **Toxicol Appl Pharmacol**, 115: 98-106, 1992

KOBIALKA, M.; GORCZYCA, W. A. [The effect of cGMP on the function of immune system cells]. **Postepy Hig Med Dosw**, 55: 195-210, 2001

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

KOLB, H.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? **Immunol Today**, 19: 556-61, 1998

- KOSARIKOV, D. N.; LEE, J. M.; UVERSKY, V. N.; COUNTS GERBER, N. Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. **J Inorg Biochem**, 87: 267-76, 2001
- KRISTOF, A. S.; MARKS-KONCZALIK, J.; MOSS, J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. **J Biol Chem**, 276: 8445-52, 2001
- KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clin Exp Immunol**, 113: 147-56, 1998
- LAGENTE, V.; CARRE, C.; KYRIACOPOULOS, F.; BOICHOT, E.; MENCIA-HUERTA, J. M.; BRAQUET, P. Inhibitory effect of cyclosporin A on eosinophil infiltration in the guinea-pig lung induced by antigen, platelet-activating factor and leukotriene B4. **Eur Respir J**, 7: 921-6, 1994a
- LAGENTE, V.; MOODLEY, I.; PERRIN, S.; MOTTIN, G.; JUNIEN, J. L. Effects of isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors on eosinophil infiltration in the guinea-pig lung. **Eur J Pharmacol**, 255: 253-6, 1994b
- LANDING, B. H.; SHIRKEY, H. S. A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes. **Pediatrics**, 20: 431-8, 1957
- LASKIN, D. L.; BEAVIS, A. J.; SIRAK, A. A.; O'CONNELL, S. M.; LASKIN, J. D. Differentiation of U-937 histiocytic lymphoma cells towards mature neutrophilic granulocytes by dibutyryl cyclic adenosine-3',5'-monophosphate. **Cancer Res**, 50: 20-5, 1990
- LIDBURY, P. S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; VANE, J. R. Interactions of iloprost and sodium nitroprusside on vascular smooth muscle and platelet aggregation. **Br J Pharmacol**, 98: 1275-80, 1989

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S. ,et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev**, 52: 375-414, 2000

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, 15: 323-50, 1997

MANIATIS, T. F., E.F. AND SAMBROOK, J. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. In: MANIATIS, T. F., E.F. AND SAMBROOK, J. **Molecular Cloning**. 2^a ed. 1990. p.

MARTIN, E.; LEE, Y. C.; 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**, 98: 12938-42, 2001

MAXEY, K. M., MADDIPATI, K.R. AND BIRKMEIER, J. Interference in immunoassays. **J. Clin. Immunoassay**, 15: 116-20, 1992

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem**, 244: 6049-55, 1969

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 43: 109-42, 1991

MONTMINY, M. R.; SEVARINO, K. A.; WAGNER, J. A.; MANDEL, G.; GOODMAN, R. H. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83: 6682-6, 1986

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**, 109: 1711-3, 2004

MULSCH, A.; BAUERSACHS, J.; SCHAFER, A.; STASCH, J. P.; KAST, R.; BUSSE, R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. **Br J Pharmacol**, 120: 681-9, 1997

MUTHUSAMY, N.; LEIDEN, J. M. A protein kinase C-, Ras-, and RSK2-dependent signal transduction pathway activates the cAMP-responsive element-binding protein transcription factor following T cell receptor engagement. **J Biol Chem**, 273: 22841-7, 1998

MUZAFFAR, S.; SHUKLA, N.; ANGELINI, G.; JEREMY, J. Y. Nitroaspirins and morpholinosydnonimine but not aspirin inhibit the formation of superoxide and the expression of gp91phox induced by endotoxin and cytokines in pig pulmonary artery vascular smooth muscle cells and endothelial cells. **Circulation**, 110: 1140-7, 2004

NIEDBALA, W.; WEI, X. Q.; CAMPBELL, C.; THOMSON, D.; KOMAI-KOMA, M.; LIEW, F. Y. 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**, 99: 16186-91, 2002

OHLSTEIN, E. H.; WOOD, K. S.; IGNARRO, L. J. 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: 187-98, 1982

OLSSON, I. L.; BREITMAN, T. R. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. **Cancer Res**, 42: 3924-7, 1982

OLSSON, I. L.; BREITMAN, T. R.; GALLO, R. C. Priming of human myeloid leukemic cell lines HL-60 and U-937 with retinoic acid for differentiation effects of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents and a T-lymphocyte-derived differentiation factor. **Cancer Res**, 42: 3928-33, 1982

OLSSON, I. L.; BREITMAN, T. R.; SARNGADHARAN, M. G.; GALLO, R. C. Mechanisms for induction of differentiation in the human promyelocytic cell line HL-60. **Haematol Blood Transfus**, 28: 384-5, 1983

PARKOS, C. A.; DINAUER, M. C.; WALKER, L. E.; ALLEN, R. A.; JESAITIS, A. J.; ORKIN, S. H. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 85: 3319-23, 1988

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; CHABARDES, D.; GUIZO, N. Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. **Anal Chem**, 61: 447-53, 1989

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, 306: 174-6, 1983

ROMAN, V.; DUGAS, N.; ABADIE, A.; AMIRAND, C.; ZHAO, H.; DUGAS, B. ,et al. Characterization of a constitutive type III nitric oxide synthase in human U937 monocytic cells: stimulation by soluble CD23. **Immunology**, 91: 643-8, 1997

ROOS, D.; DE BOER, M.; KURIBAYASHI, F.; MEISCHL, C.; WEENING, R. S.; SEGAL, A. W. ,et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Blood**, 87: 1663-81, 1996

SEGAL, A. W.; HARPER, A. M.; GARCIA, R. C.; MERZBACH, D. The action of cells from patients with chronic granulomatous disease on *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol**, 15: 441-9, 1982

SINGH, A. P.; SOMMER, H. M. Sensory nerve conduction studies of the L-1/L-2 Dorsal rami. **Arch Phys Med Rehabil**, 77: 913-5, 1996

SPIECKER, M.; DARIUS, H.; KABOTH, K.; HUBNER, F.; LIAO, J. K. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. **J Leukoc Biol**, 63: 732-9, 1998

STASCH, J. P.; 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**, 135: 333-43, 2002

STASCH, J. P.; BECKER, E. M.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; DEMBOWSKY, K.; FEURER, A. ,et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, 410: 212-5, 2001

STONE, J. R.; MARLETTA, M. A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. **Biochemistry**, 33: 5636-40, 1994

STRAUB, A.; BENET-BUCKHOLZ, J.; FRODE, R.; KERN, A.; KOHLSDORFER, C.; SCHMITT, P. ,et al. Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. **Bioorg Med Chem**, 10: 1711-7, 2002

STRAUB, A.; STASCH, J. P.; ALONSO-ALIJA, C.; BENET-BUCHHOLZ, J.; DUCKE, B.; FEURER, A. ,et al. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. **Bioorg Med Chem Lett**, 11: 781-4, 2001

- STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochim Biophys Acta**, 1411: 217-30, 1999
- SUNDSTROM, C.; NILSSON, K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). **Int J Cancer**, 17: 565-77, 1976
- TASKEN, K.; AANDAHL, E. M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. **Physiol Rev**, 84: 137-67, 2004
- TAUBER, A. I.; BORREGAARD, N.; SIMONS, E.; WRIGHT, J. Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. **Medicine (Baltimore)**, 62: 286-309, 1983
- TENOR, H.; HATZELMANN, A.; CHURCH, M. K.; SCHUDT, C.; SHUTE, J. K. Effects of theophylline and rolipram on leukotriene C4 (LTC4) synthesis and chemotaxis of human eosinophils from normal and atopic subjects. **Br J Pharmacol**, 118: 1727-35, 1996
- THOMAZZI, S. M.; MOREIRA, J.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. 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: 875-82, 2005
- TRAYLOR, T. G.; SHARMA, V. S. Why NO? **Biochemistry**, 31: 2847-9, 1992
- TSUCHIYA, S.; KOBAYASHI, Y.; GOTO, Y.; OKUMURA, H.; NAKAE, S.; KONNO, T., et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. **Cancer Res**, 42: 1530-6, 1982
- TSUCHIYA, S.; MINEGISHI, N.; MINEGISHI, M.; SATO, T.; KONNO, T. Adaptation of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) in a protein-free chemically defined medium. **Tohoku J Exp Med**, 150: 455-65, 1986

TSUCHIYA, S.; YAMABE, M.; YAMAGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KONNO, T.; TADA, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **Int J Cancer**, 26: 171-6, 1980

VANUFFELEN, B. E.; VAN DER ZEE, J.; DE KOSTER, B. M.; VANSTEVENINCK, J.; ELFERINK, J. G. Intracellular but not extracellular conversion of nitroxyl anion into nitric oxide leads to stimulation of human neutrophil migration. **Biochem J**, 330 (Pt 2): 719-22, 1998

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol Rev**, 39: 163-96, 1987

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**, 91: 2592-6, 1994

WOHLFART, P.; MALINSKI, T.; RUETTEN, H.; SCHINDLER, U.; LINZ, W.; SCHOENAFINGER, K. ,et al. Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase. **Br J Pharmacol**, 128: 1316-22, 1999

ZHAO, Y.; BRANDISH, P. E.; DIVALENTIN, M.; SCHELVIS, J. P.; BABCOCK, G. T.; MARLETTA, M. A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, 39: 10848-54, 2000