



LINEU BALDISSERA JÚNIOR

EFEITOS DA ATIVAÇÃO DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL PELO BAY 60-2770  
SOBRE A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR MURINA E ATIVIDADE  
QUIMIOTÁTICA DE EOSINÓFILOS HUMANOS ISOLADOS

CAMPINAS

2015





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

LINEU BALDISSERA JÚNIOR

EFEITOS DA ATIVAÇÃO DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL PELO BAY 60-2770  
SOBRE A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR MURINA E ATIVIDADE  
QUIMIOTÁTICA DE EOSINÓFILOS HUMANOS ISOLADOS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR: EDSON ANTUNES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO  
ALUNO LINEU BALDISSERA JÚNIOR, E ORIENTADO PELO  
PROF. DR. EDSON ANTUNES.

---

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Juliana Ravaschio Franco de Camargo - CRB 8/6631

B193e Baldissera Júnior, Lineu, 1982-  
Efeitos da ativação da guanilil ciclase solúvel pelo BAY 60-2770 sobre a inflamação alérgica pulmonar murina e atividade quimiotática de eosinófilos humanos isolados / Lineu Baldissera Júnior. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Edson Antunes.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inflamação. 2. Asma. 3. Eosinófilos. 4. BAY 60-2770. 5. Guanilato Ciclase. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effects of soluble guanylyl cyclase activation by BAY 60-2770 on murine pulmonary allergic inflammation and chemotactic activity of isolated human eosinophils

**Palavras-chave em inglês:**

Inflammation

Asthma

Eosinophils

BAY 60-2770

Guanylate cyclase

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Doutor em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Edson Antunes [Orientador]

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

Sisi Marcondes Paschoal

Stella Regina Zamuner

**Data de defesa:** 19-01-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LINEU BALDISSERA JÚNIOR

ORIENTADOR PROF. DR. EDSON ANTUNES

### MEMBROS:

1. PROF. DR. EDSON ANTUNES

2. PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

3. PROFA. DRA. SUZANA BEATRIZ VERISSIMO DE MELLO

4. PROFA. DRA. SISI MARCONDES PASCHOAL

5. PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

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

Data: 19 de janeiro de 2015



O recrutamento de eosinófilos para o pulmão inflamado é uma característica central da asma alérgica. Há relatos de que a ativação da guanilil ciclase solúvel (GCs) exerce atividade anti-inflamatória por inibir o recrutamento de leucócitos, e que o aumento de GMPc intracelular inibe a migração *in vitro* de eosinófilos humanos. A GCs é estimulada pelo NO, seu agonista fisiológico. Outros compostos são capazes de estimular a GCs de forma independente do NO, como as moléculas da família dos estimuladores NO-independentes e heme-dependentes, e, mais recentemente, por compostos estimuladores NO- e heme-independentes, chamados de ativadores da GCs. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do BAY 60-2770 (ativador NO- e heme-independente da GCs) em modelo murino de asma alérgica e na quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos induzida pela eotaxina. Para tanto, camundongos machos C57Bl6 (25 g, 6 semanas de idade) foram sensibilizados (2 injeções s.c. de 100 µg de ovalbumina, nos dias 0 e 7) e submetidos ao desafio intranasal com OVA (10 µg; duas vezes por dia, com intervalos de 6 horas entre cada desafio) nos dias 14 e 15, na presença e/ou ausência (veículo) do tratamento crônico com BAY 60-2770 (1mg/Kg/gavage; 14 dias). Os animais foram anestesiados e sacrificados 48 horas após o primeiro desafio, e as amostras biológicas colhidas para análise. O perfil inflamatório alérgico foi avaliado através da contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA), sangue periférico, perfusato de medula óssea (MO) e em corte histológico. Foram dosados os níveis de IgE sérica específica a OVA, citocinas Th<sub>1</sub> (IFN-γ), Th<sub>2</sub> (IL-4, IL-5, IL-10), TNF-α e eotaxina no LBA. A expressão protéica da GCs (subunidades α<sub>2</sub> e β<sub>1</sub>) e da iNOS foi quantificada no parênquima pulmonar. O desenho experimental foi dividido em quatro grupos, a saber: grupo tratado com Veículo e instilado com Salina (VS); grupo tratado com Veículo e desafiado com OVA (VO); grupo tratado com BAY 60-2770 e instilado com Salina (BS); grupo tratado com o BAY 60-2770 e desafiado com OVA (BO). Nossos resultados mostraram níveis elevados ( $p < 0,05$ ) de IgE em soro de animais sensibilizados comparados com animais naive, confirmando a eficácia da sensibilização, que não foi alterada pelo tratamento com BAY 60-2770. O desafio alérgico à OVA (grupo VO), como

esperado, gerou uma resposta inflamatória alérgica pulmonar, caracterizada pela presença marcante de eosinófilos no pulmão e de níveis elevados de IL-4 no LBA, assim como eosinofilia sanguínea e eosinofilopoese na medula óssea. Esta resposta foi significativamente acompanhada da redução da expressão da GCs (subunidades  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ ) e aumento da expressão protéica da iNOS no parênquima pulmonar, comparada a animais não desafiados (grupo VS). Não foram observadas diferenças nos níveis de TNF- $\alpha$  e eotaxina no LBA entre os grupos. As citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 não foram detectadas no LBA em nenhum grupo experimental. O tratamento crônico com BAY 60-2770 (grupo BO) reduziu significativamente os níveis de IL-4 e IL-5 no LBA, inibiu a eosinofilia pulmonar (LBA), sanguínea e peri-bronquiolar, e suprimiu a eosinofilopoese na medula óssea, os quais foram acompanhados da restauração da expressão da GCs ( $\alpha_1$  e  $\beta_1$ ) e da iNOS no parênquima pulmonar, comparado com o grupo desafiado tratado com veículo (grupo VO). Em experimentos separados, eosinófilos humanos de indivíduos saudáveis foram submetidos aos ensaios de quimiotaxia induzida por eotaxina (300 ng/mL) na presença do BAY 60-2770 individualmente e/ou co-incubado com inibidor da GCs, ODQ (10  $\mu$ M). Nas mesmas condições, foram determinados os níveis de GMPc intracelular, e realizado o teste de viabilidade celular por redução do MTT. A resposta quimiotática induzida por eotaxina foi significativamente inibida pelo BAY 60-2770 (10  $\mu$ M), de modo dependente de GMPc. O efeito inibitório do BAY 60-2770 foi potencializado pela prévia co-incubação com ODQ, que elevou marcadamente os níveis de GMPc intracelulares e inibiu significativamente a migração de eosinófilos frente à eotaxina nas concentrações de 1, 3 e 5  $\mu$ M de BAY 60-2770. A viabilidade celular não foi afetada pelo BAY 60-2770. Em conjunto, nossos resultados mostram que o BAY 60-2770 é capaz de reduzir a inflamação alérgica pulmonar murina, e de inibir de forma dependente de GMPc a migração de eosinófilos humanos induzida por eotaxina. Concluímos que o BAY 60-2770 apresenta potencial valor terapêutico na asma alérgica.

Palavras-chave: Inflamação, Asma, Eosinófilos, BAY 60-2770, Guanilato ciclase.



Eosinophil recruitment to inflamed lung is a hallmark of allergic asthma. The literature has shown that soluble guanylyl cyclase (sGC) plays a key antiinflammatory role by inhibiting leukocyte recruitment, and that increased cGMP intracellular levels inhibit human eosinophil chemotaxis *in vitro*. The soluble guanylyl cyclase is stimulated by NO, its physiological agonist. Other compounds are able to NO-independently stimulate sGC, such as the family of NO-independent and heme-dependent stimulators, and the NO- and heme-independent stimulators, known as sGC activators. Therefore, this study aimed to investigate the effects of BAY 60-2770 (NO- and haem-independent sGC activator) in pulmonary allergic inflammation in mice and human eosinophil chemotaxis *in vitro* induced by eotaxin. Part I: Male C57BL6 mice were sensitized (100 µg of ovalbumin, s.c.; day 0 and 7) and intranasally challenged with OVA (10 µg; twice a day, 6 h between challenges) at days 14 and 15, with BAY 60-2770 (1 mg/Kg/gavage; 14 days) and/or its vehicle. Mice were anaesthetized and exsanguinated at 48 hours post first-OVA challenge, and biological samples were collected. The inflammatory profile was evaluated by total and differential cell counts in bronchoalveolar lavage (BAL) fluids, peripheral blood, bone marrow perfusate and histological slides. Serum OVA-specific IgE levels were measured and Th<sub>1</sub> (IFN-γ), Th<sub>2</sub> (IL-4, IL-5, IL-10) cytokines, TNF-α and eotaxin levels were quantified in BAL fluids. Soluble guanylyl cyclase subunits (α<sub>1</sub> and β<sub>1</sub>) and iNOS protein expression were determined in lung parenchyma. The experimental design was divided in four groups, namely: Vehicle treated-instilled with Saline (VS group); Vehicle treated-challenged with OVA (VO group); BAY 60-2770 treated-instilled with Saline (BS group) and BAY 60-2770 treated-challenged with OVA (BO group). Our results showed seric elevated IgE levels ( $p<0.05$ ) in OVA-sensitized mice compared with naive animals, confirming the efficiency of sensitization procedure, which was not affected under BAY 60-2770 treatment. As expected, the OVA-challenge in VO group triggered a pulmonary allergic inflammatory response, characterized by markedly eosinophil migration to lung, elevated IL-4 levels in BAL fluid, as well as blood eosinophilia and marrow eosinophilopoiesis in bone marrow. This response was significantly accompanied by

reduced GCs (subunits  $\alpha_1$  and  $\beta_1$ ) and increased iNOS expression in lung parenchyma, compared with non-challenged animals (VS group). No differences on TNF- $\alpha$  and eotaxin levels in BAL fluids were observed among studied groups. Levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 were not detected in BAL fluids of any groups. Chronic oral treatment with BAY 60-2770 (BO group) significantly reduced IL-4 and IL-5 levels in BAL fluids, inhibited pulmonary (BAL), blood and peri-bronchiolar eosinophilia, and suppressed bone marrow eosinophilopoiesis, which was accompanied by restoration of sGC and iNOS expression in lung parenchyma, compared with vehicle treated group (VO). In separate experiments, isolated human eosinophils from healthy volunteers were individually incubated with BAY 60-2770 and/or previously co-incubated with the sGC inhibitor, ODQ (10  $\mu$ M), and allowed to migrate toward eotaxin (300 ng/ml; 1 h, 37°C) in chemotaxis chamber. In the same conditions, intracellular cGMP levels were determined and cell viability test were performed by MTT reduction. Our data showed that human eosinophil migration to eotaxin was significantly inhibited by BAY 60-2770 (10  $\mu$ M) in a cGMP-dependent manner. Inhibitory effect of BAY 60-2770 was potentiated by previous co-incubation with ODQ, which markedly elevated cGMP intracellular levels and inhibited eosinophils migration induced by eotaxin at 1, 3 and 5  $\mu$ M BAY 60-2770 concentrations. The cell viability was not affected by BAY 60-2770. Together, our results show that BAY 60-2770 is able to reduce murine pulmonary allergic inflammation, and to inhibit human eosinophil migration toward eotaxin in cGMP-dependent manner. In conclusion, the compound BAY 60-2770 presents potential therapeutic value in allergic asthma.

**Key words:** Inflammation, Asthma, Eosinophils, BAY 60-2770, Guanylate cyclase.

<b>RESUMO.....</b>	<b><i>vii</i></b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b><i>ix</i></b>
<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b><i>xv</i></b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b><i>xvii</i></b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS.....</b>	<b><i>xix</i></b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b><i>xxi</i></b>
<b>LISTA DE MATERIAIS.....</b>	<b><i>xxiii</i></b>
<b>1-INTRODUÇÃO.....</b>	<b><i>1</i></b>
<b>1.1 – Asma alérgica: Definição e Epidemiologia.....</b>	<b><i>1</i></b>
<b>1.2 – Patogênese da asma alérgica.....</b>	<b><i>3</i></b>
1.2.1 – Sensibilização (Imunização).....	<i>3</i>
1.2.2 – Desafio antigênico e resposta asmática imediata.....	<i>4</i>
1.2.3 – Resposta asmática tardia.....	<i>4</i>
<b>1.3 – Modelos animais de asma alérgica.....</b>	<b><i>5</i></b>
<b>1.4 – Eosinófilos e asma.....</b>	<b><i>6</i></b>
<b>1.5 – Sinalização NO-CGs-GMPc na asma.....</b>	<b><i>9</i></b>
<b>1.6 – Guanilil ciclase solúvel: estrutura e ativação.....</b>	<b><i>12</i></b>
<b>1.7 – Estimuladores e Ativadores da CGs.....</b>	<b><i>14</i></b>

<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 – Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 – Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
 <b>3 – MÉTODOS.....</b>	 <b>19</b>
<b>3.1 – Animais.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 – Sensibilização ao alérgeno e desafio intranasal.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 – Lavado broncoalveolar (LBA).....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 – Perfusato de medula óssea.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 - Contagem de leucócitos circulantes.....</b>	<b>21</b>
<b>3.6 – Administração crônica do BAY 60-2770.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7 – Grupos experimentais.....</b>	<b>22</b>
<b>3.8 – Análise histológica.....</b>	<b>22</b>
<b>3.9 – Pressão sanguínea sistólica.....</b>	<b>23</b>
<b>3.10 – Dosagens séricas e/ou no lavado bronco-alveolar (LBA).....</b>	<b>23</b>
<b>3.11 – Western Blotting.....</b>	<b>23</b>
<b>3.12 – Isolamento de eosinófilo humano.....</b>	<b>24</b>
<b>3.13 – Separação imunomagnética de eosinófilos.....</b>	<b>25</b>
<b>3.14 – Ensaio de quimiotaxia.....</b>	<b>26</b>
<b>3.15 – Ensaio de viabilidade celular (redução de MTT).....</b>	<b>27</b>
<b>3.16 – Extração de GMP cíclico de eosinófilos humanos isolados.....</b>	<b>27</b>
<b>3.17 – Análises Estatísticas.....</b>	<b>28</b>
 <b>4 – RESULTADOS.....</b>	 <b>29</b>
<b>4.1 - Níveis de IgE sérica específica à ovalbumina (OVA).....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 - Pressão arterial caudal.....</b>	<b>30</b>

<b>4.3 - Efeitos do BAY 60-2770 sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar à OVA.....</b>	<b>30</b>
4.3.1 - Número de leucócitos totais no lavado bronco-alveolar (LBA).....	31
4.3.2 - Número diferencial de leucócitos no LBA.....	31
4.3.3 - Número de leucócitos no sangue circulante.....	32
4.3.4 - Análise histológica pulmonar.....	34
4.3.5 - Número de leucócitos em perfusato de medula óssea.....	36
4.3.6 - Dosagens de citocinas e eotaxina no LBA.....	37
4.3.7 - Expressão protéica da GCs da iNOS pulmonar.....	38
4.3.8 - Expressão protéica da GCs (subunidades $\alpha_1/\beta_1$ ) pulmonar.....	39
 <b>4.4 - Quimiotaxia <i>in vitro</i> de eosinófilos humanos isolados.....</b>	 <b>41</b>
4.4.1 - Efeitos do BAY 60-2770 sobre a quimiotaxia de eosinófilos em resposta à eotaxina.....	41
4.4.2 - Efeitos da oxidação da GCs pelo ODQ na migração de eosinófilos em resposta à eotaxina.....	42
4.4.3 - Efeito do BAY 60-2770 na migração de eosinófilos em resposta à eotaxina após oxidação da GCs .....	43
4.4.4 - Dosagem de GMP cíclico.....	44
4.4.5 - Efeitos do BAY 60-2770 sobre a viabilidade do eosinófilo.....	45
 <b>5 – DISCUSSÃO.....</b>	 <b>47</b>
 <b>6 – SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....</b>	 <b>57</b>
 <b>REFERÊNCIAS.....</b>	 <b>59</b>
 <b>ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....</b>	 <b>85</b>
<b>ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>86</b>



## ***DEDICATÓRIA***

---

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida...

a Deus...

a minha amada esposa, Fernanda

aos meus amados pais, Lineu e Célia

as minhas amadas irmãs, Cristiane e Aline

ao meu irmão Flávio





## **AGRADECIMENTOS**

---

A Deus, por ter permitido a finalização de mais uma etapa da minha carreira profissional e pessoal, por ter me sustentado fisicamente, emocional e espiritualmente, por me deixar contemplar mais uma obra Sua em minha existência... a Ele, toda a honra e glória!

Em especial e pela segunda vez, ao meu estimado orientador, professor e amigo Dr. Edson Antunes, que, com muita sabedoria e paciência, soube me conduzir nesta jornada, principalmente nos momentos mais instáveis. Obrigado por ter acreditado em mim!

Às minhas queridas companheiras de laboratório, Gláucia, Dalize, Diana, Marina, Elisa, Carol e Camila; aos cascadeiros Fábio, Celso, Eduardo, Fabiano, Luiz e Julio... à todos, obrigado pelas trocas de experiências, contribuições técnico-científicas, divertida companhia e boa convivência...

Aos professores Dr. Gabriel Forato Anhô, Dr. Gilberto De Nucci, Dra. Sisi Marcondes, Dr. Stephen Hyslop, por cederem seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Aos queridos colaboradores, pela excepcional contribuição técnico-científica. Dalize Maria Squebola Cola, Marina Ciarallo Calixto, André Lisboa Rennó, Ana Paula de Lima Barbosa... sem vocês este trabalho não seria possível...

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e apoio financeiro.



## LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

---

<b>FIGURA 1.</b> Níveis de IgE sérica específica à OVA.....	<b>29</b>
<b>FIGURA 2.</b> Pressão arterial após tratamento crônico com BAY 60-2770.....	<b>30</b>
<b>FIGURA 3.</b> Efeito do tratamento crônico com o BAY 60-2770 no infiltrado de leucócitos totais no lavado broncoalveolar (LBA).....	<b>31</b>
<b>FIGURA 4.</b> Efeito do tratamento crônico com o BAY 60-2770 sobre o perfil de células inflamatórias no LBA 48 horas após desafio à OVA.....	<b>32</b>
<b>FIGURA 5.</b> Efeito do tratamento crônico com BAY 60-2770 sobre o número de leucócitos no sangue circulante.....	<b>33</b>
<b>FIGURA 6.</b> Análise histológica do parênquima pulmonar.....	<b>35</b>
<b>FIGURA 7.</b> Efeito do tratamento crônico com BAY 60-2770 no número de leucócitos em perfusato de medula óssea.....	<b>36</b>
<b>FIGURA 8.</b> Efeito do tratamento crônico com BAY 60-2770 sobre os níveis de TNF- $\alpha$ (A), eotaxina (B), IL-4 (C) e IL-5 (D) no LBA.....	<b>37</b>
<b>FIGURA 9.</b> Expressão protéica (A) da iNOS (B) no tecido pulmonar por Western blotting.....	<b>38</b>
<b>FIGURA 10.</b> Expressão protéica (A) das subunidades $\alpha_1$ (B) e $\beta_1$ (C) da GCs no tecido pulmonar por Western blotting.....	<b>40</b>
<b>FIGURA 11.</b> Efeitos do BAY 60-2770 sobre a quimiotaxia de eosinófilo em resposta à eotaxina.....	<b>42</b>
<b>FIGURA 12.</b> Efeito da oxidação da GCs pelo ODQ na resposta migratória de eosinófilos à eotaxina in vitro.....	<b>43</b>
<b>FIGURA 13.</b> Oxidação da GCs e o efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a migração de eosinófilo em reposta à eotaxina.....	<b>44</b>
<b>FIGURA 14.</b> Quantificação de GMPc em eosinófilos humanos.....	<b>45</b>
<b>FIGURA 15.</b> Efeitos do BAY 60-2770 sobre a viabilidade de eosinófilos.....	<b>46</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AMPc</b>	<i>adenosina 3'-5' monofosfato cíclico</i>
<b>APC</b>	<i>célula apresentadora de antígeno</i>
<b>BSA</b>	<i>albumina sérica bovina</i>
<b>CCR3</b>	<i>(receptor de eotaxina) receptor 3 de quimiocina tipo C-C</i>
<b>CCL11</b>	<i>(eotaxina-1) quimiocina C-C ligante 11</i>
<b>CCL24</b>	<i>(eotaxina-2) quimiocina C-C ligante 24</i>
<b>CCL26</b>	<i>quimiocina C-C ligante 26</i>
<b>CysLT1</b>	<i>cisteinil leucotrieno 1</i>
<b>ECP</b>	<i>proteína catiônica de eosinófilo</i>
<b>EDN</b>	<i>neurotoxina derivada de eosinófilo</i>
<b>EDTA</b>	<i>ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
<b>EPO</b>	<i>peroxidase de eosinófilo</i>
<b>ERNs</b>	<i>espécies reativas de nitrogênio</i>
<b>EROs</b>	<i>espécies reativas de oxigênio</i>
<b>FAD</b>	<i>flavina-adenina dinucleotídeo</i>
<b>FcεRI</b>	<i>receptor Fc épsilon I</i>
<b>FMN</b>	<i>flavina mononucleotídeo</i>
<b>GMPc</b>	<i>guanosina 3'-5' monofosfato cíclico</i>
<b>GAPDH</b>	<i>gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase</i>
<b>GCs</b>	<i>guanilil (guanilato) ciclase solúvel</i>
<b>GCp</b>	<i>guanilil (guanilato) ciclase particulada</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos</i>
<b>ICAM-1</b>	<i>molécula de adesão intercelular-1</i>
<b>IL</b>	<i>Interleucina</i>

<b><i>IgE</i></b>	<i>Imunoglobulina E</i>
<b><i>JAK</i></b>	<i>Janus quinase</i>
<b><i>LBA</i></b>	<i>lavado broncoalveolar</i>
<b><i>LPS</i></b>	<i>Lipopolissacarídeo</i>
<b><i>LTC4</i></b>	<i>leucotrieno C4</i>
<b><i>LTD4</i></b>	<i>leucotrieno D4</i>
<b><i>Mac-1</i></b>	<i>antígeno 1 de macrófago</i>
<b><i>MBP</i></b>	<i>proteína básica principal</i>
<b><i>MHC-II</i></b>	<i>complexo principal de histocompatibilidade tipo II</i>
<b><i>MEM</i></b>	<i>meio essencial mínimo</i>
<b><i>MCP-1</i></b>	<i>(CCL2) proteína 1 quimiotraente de monócitos</i>
<b><i>NO</i></b>	<i>óxido nítrico</i>
<b><i>NOS</i></b>	<i>óxido nítrico sintase</i>
<b><i>OVA</i></b>	<i>Ovalbumina</i>
<b><i>PAF</i></b>	<i>fator ativador de plaquetas</i>
<b><i>PBS</i></b>	<i>tampão fosfato salina</i>
<b><i>PAGE</i></b>	<i>gel de poliacrilamida</i>
<b><i>PDE</i></b>	<i>Fosfodiesterase</i>
<b><i>PGD2</i></b>	<i>prostaglandina D2</i>
<b><i>PSGL-1</i></b>	<i>glicoproteína ligante de P-selectina 1</i>
<b><i>RANTES</i></b>	<i>regulada por ativação, expressa e secretada por células T normais</i>
<b><i>TNF-<math>\alpha</math></i></b>	<i>fator de necrose tumoral alfa</i>
<b><i>TXA<sub>2</sub></i></b>	<i>tromboxano A<sub>2</sub></i>
<b><i>Th<sub>2</sub></i></b>	<i>célula T auxiliar tipo 2</i>
<b><i>VCAM-1</i></b>	<i>molécula de adesão da célula vascular-1</i>
<b><i>VLA-4</i></b>	<i>antígeno tardio 4</i>

## LISTA DE MATERIAIS

---

<i>Anticorpo anti-subunidade <math>\beta_1</math> (GCs)</i>	<i>Novus Biologicals (EUA)</i>
<i>Anticorpo anti-subunidade <math>\alpha_1</math> (GCs)</i>	<i>AbCam Technology (Inglaterra)</i>
<i>Anticorpo anti iNOS</i>	<i>AbCam Technology (Inglaterra)</i>
<i>BSA</i>	<i>Sigma (EUA)</i>
<i>BAY 60-2770</i>	<i>Bayer Wuppertal, (Alemanha)</i>
<i>Cremophor</i>	<i>Sigma (EUA)</i>
<i>Diff Quick</i>	<i>Baxter Healthcare Corp. (EUA)</i>
<i>Eotaxina</i>	<i>R&amp;D Systems™ (EUA)</i>
<i>Isoflurano</i>	<i>Isoforine®, Cristália (Brasil)</i>
<i>Kit IgE Ova-específica</i>	<i>BioLegends Inc (EUA)</i>
<i>Kit GMPc</i>	<i>Cayman (EUA)</i>
<i>Kits ELISA dosagem de citocinas</i>	<i>R&amp;D Systems™ (EUA)</i>
<i>MEM</i>	<i>Sigma (EUA)</i>
<i>Microbeads anti-CD16</i>	<i>Miltenyi Biotec (Alemanha)</i>
<i>MTT</i>	<i>Sigma (EUA)</i>
<i>Ovalbumina grau V</i>	<i>Sigma (EUA)</i>
<i>ODQ</i>	<i>Sigma (EUA)</i>
<i>Percoll</i>	<i>Sigma(EUA)</i>
<i>Transcutol</i>	<i>Sigma(EUA)</i>
<i>Trizma-base</i>	<i>Sigma (EUA)</i>
<i>Filtro de polycarbonato (5<math>\mu</math>m/25x80mm)</i>	<i>GE Water &amp; Process Technologies (EUA)</i>





### 1.1. Asma alérgica: Definição e Epidemiologia

A asma alérgica é definida como uma reação de hipersensibilidade do tipo I, sendo caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, que desencadeia quadros recorrentes de hiperreatividade brônquica, promovendo obstrução do fluxo aéreo pulmonar, levando o indivíduo à falta de ar, tosse, sibilo, aumento da pressão torácica e dispnéia, cujos episódios podem ser reversíveis espontaneamente ou com terapia medicamentosa.

De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013), aproximadamente 300 milhões de indivíduos no mundo são acometidos por crises de asma, sendo considerada a doença crônica mais comum entre crianças. A asma afeta em torno de 9,1% ou aproximadamente 6,7 milhões de crianças (com idade entre 0 e 17 anos) nos Estados Unidos (Akinbami e col., 2009). No Brasil, estima-se que cerca de 18 milhões de indivíduos sejam asmáticos (aproximadamente 10% da população), levando a uma média anual de 350.000 internações, ocupando assim a 4ª maior causa de internações no Sistema Único de Saúde (SUS; 2,3% do total) e a terceira em crianças e adultos jovens (Ministério da Saúde, 2000). A prevalência da asma ativa mostrou-se reduzida (18,5% vs 17,5%) entre adolescentes de 13 a 14 anos, mas observou-se uma elevação da frequência da asma grave (4,5% vs 4,7%), de acordo com estudo evolutivo comparando dados de 2003 a 2012 em 7 cidades brasileiras, onde foi avaliado a prevalência dos sintomas relacionados à asma (Solé e col., 2014).

Esta doença é considerada um problema mundial de saúde pública, independentemente do nível de desenvolvimento, embora mais de 80% das mortes associadas à doença ocorram em países de baixa e média renda (WHO, 2013). Os países da América Latina, incluindo o Brasil, vêm sofrendo com o rápido processo de mudanças na população, que inclui urbanização, migração, desenvolvimento econômico e a adoção do “moderno estilo de vida”. Neste contexto, a asma e as doenças alérgicas estão entre os principais problemas de saúde pública em ascensão, principalmente na população infantil (Cooper col., 2006; Pearce e Douwes, 2006).

A elevada prevalência tem sido atribuída à urbanização, caracterizada pela poluição, tabagismo passivo, redução da exposição à agentes infecciosos, dieta desequilibrada, e outras mudanças no estilo de vida (Eder e col., 2006). Além disso, o sobrepeso/obesidade tem sido associado a um maior fator de risco para o desenvolvimento de asma (Papoutsakis e col., 2013).

O estudo multicêntrico *The International Study for Asthma and Allergies in Childhood* – (ISAAC), realizado em 56 países, mostrou uma variabilidade de asma ativa de 1,6% a 36,8%, estando o Brasil em 8º lugar, com uma prevalência média de 20% na população infantil (ISAAC, 1998). De acordo com o mesmo estudo (ISAAC – Fase 3) realizado com população infantil de 20 cidades brasileiras, a média de prevalência da asma ativa é de aproximadamente 24,3% em crianças com idade de 6-7 anos, e de 19% na população de adolescentes com 13-14 anos (Solé e col., 2006).

A asma é considerada uma doença inflamatória crônica que envolve interações entre fatores externos e genéticos (Vargaftig, 1999; Cooper e col., 2006), e tem como características principais a inflamação pulmonar e a hiperreatividade brônquica (O'Byrne e col., 1999; Cockcroft e Davis, 2006). Evidências científicas associam a existência de hiperreatividade brônquica, com a inflamação das vias aeríferas, mas os mecanismos exatos envolvidos nesta associação não estão esclarecidos (Cockcroft e Davis, 2006). Além disso, a literatura mostra que a hiperreatividade brônquica também pode ocorrer em indivíduos sem asma, podendo ser encontrada em 10-15% da população não asmática (Lilly, 2005).

Clinicamente, a asma se caracteriza por crises de dispnéia, tosse e sibilos. É uma doença episódica, alternando crises agudas com períodos assintomáticos. Embora seja rara, uma crise aguda de asma pode levar à morte (Kroegel e col., 1993; McFadden, 1994). A asma é tradicionalmente dividida em 2 tipos básicos: asma intrínseca e extrínseca (Martinez e Vercelli, 2013). A asma intrínseca se caracteriza por história negativa para alergia, testes cutâneos e níveis séricos de imunoglobulina E (IgE) normais. Os pacientes desenvolvem os sintomas típicos de asma após contato com certos estímulos como infecção (viral, fúngica e bacteriana) das vias aeríferas superiores (Busse e col., 2010; Beigelman e col., 2014; Kumar e col., 2014), ar frio e exercício físico (Hallstrand, 2012), drogas (ex: aspirina) (Hamad e col., 2004), estresse emocional (Wright e col., 2005).

A asma extrínseca é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, induzida por um antígeno extrínseco. Este tipo inclui a asma alérgica (atópica) considerada a mais comum, e é frequentemente associada a um histórico familiar de atopia. É desencadeada por antígenos ambientais presentes na poeira, pólen, pêlos de animais, alguns alimentos, dentre outros. As crises agudas podem ser precedidas por manifestações de doenças alérgicas, como rinite, urticária ou eczema, reações cutâneas positivas à injeção intradérmica de extratos de antígenos inalados, níveis elevados de IgE no soro, e/ou respostas positivas a testes de provocação os quais envolvem a inalação de antígeno específico (Hargreave e Nair, 2009; Vernon e col., 2012).

## **1.2. Patogênese da asma alérgica**

O processo inflamatório alérgico asmático pode ser dividido em três momentos: sensibilização (ou imunização) do indivíduo, desafio antigênico (alérgico), resposta asmática imediata e resposta asmática tardia.

### **1.2.1. Sensibilização (imunização)**

O processo inflamatório alérgico tem origem a partir do primeiro contato do organismo com um antígeno protéico. Este antígeno (alérgeno) é então captado por células dendríticas situadas no epitélio das vias aéreas e submucosa (Von Garnier e col., 2005; Hammad e Lambrecht, 2006). Após o englobamento, o alérgeno é processado em peptídeos que são transportados às moléculas de sinalização do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II), presente em sua membrana plasmática, tornando a célula dendrítica uma célula apresentadora de antígeno (APC) (Riese e Chapman, 2000). Nos linfonodos, as APCs entram em contato com células T naive, apresentam-nas os peptídeos antigênicos, iniciando o processo de sensibilização e subsequente resposta imune específica ao alérgeno (Smit e Lukacs, 2006). Uma vez sensibilizadas, as células T são diferenciadas em linfócitos Th2 e tornam-se secretoras de citocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 (Holgate, 2012). As citocinas IL-4 e IL-13 induzem linfócitos B a

produzirem anticorpos do tipo IgE específico ao antígeno (Snapper e Paul, 1987; Punnonen e col., 1993). Estes anticorpos (IgE) se difundem localmente, alcançam os vasos linfáticos e posteriormente a circulação sanguínea, onde são distribuídos sistemicamente. Após ganhar acesso ao fluido intersticial, os anticorpos IgE antígenos-específicos se ligam a receptores de alta afinidade do tipo FCεRI em mastócitos residentes no tecido das vias aéreas (Galli e col., 2008).

### **1.2.2. Desafio antigênico e resposta asmática imediata**

A condição denominada de provocação ou desafio antigênico (alérgico) é caracterizada pela ligação cruzada entre o antígeno circulante e a IgE ancorada no receptor de alta-afinidade (FCεRI). Esta ligação induz uma sequência de eventos intracelulares promovendo a ativação e desgranulação mastocitária. Sob ativação, os mastócitos liberam mediadores granulares pré-formados como histamina, triptases, heparina, citocinas, e eicosanóides como a PGD<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e cisteinil-leucotrienos (LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub>) (Bradding e col., 2006). Estes mediadores promovem broncoconstrição, aumento da permeabilidade microvascular e da produção de muco, obstruindo o fluxo aéreo, originando assim a resposta asmática imediata.

### **1.2.3. Resposta asmática tardia**

A ativação mastocitária imediata contribui na transição para a resposta asmática tardia. Ocorre aumento da expressão de moléculas de adesão do endotélio vascular, da liberação de mediadores quimiotáticos (LTB<sub>4</sub> e PGD<sub>2</sub>) e de quimiocinas (RANTES, IL-8, eotaxina, CCL<sub>2</sub>), promovendo o influxo de células inflamatórias para o pulmão como monócitos, linfócitos, neutrófilos. Por meio das citocinas IL-4 e IL-5, ocorrerá a maturação e recrutamento de eosinófilos (Bradding e col., 1995; Wilson e col., 2000). A exposição repetitiva ou persistente ao alérgeno leva a uma interação complexa entre as células do infiltrado inflamatório, células epiteliais e células estruturais residentes (fibroblastos e

células da musculatura lisa), originando uma inflamação crônica, que leva ao quadro de hiperreatividade brônquica e remodelamento tecidual das vias aéreas (Galli e col., 2008).

### **1.3. Modelos animais de asma alérgica**

Devido à complexidade e heterogeneidade da asma, muitos estudos são necessários para se entender precisamente os mecanismos envolvidos em níveis moleculares e celulares; entretanto, por razões éticas e limitações experimentais, determinadas abordagens tornam-se inviáveis em humanos (Zosky e Sly, 2007).

Assim, modelos animais de asma foram introduzidos há mais de um século e são ainda bastante utilizados. Estes modelos incluem o uso de cobaia (Ricciardolo e col., 2008), camundongo (Zosky e col., 2004), rato (Suchankova e col., 2006), cão (Redman e col., 2001), e ovelha (Abraham e col., 1983). No presente estudo, adotamos o modelo alérgico em camundongo, que é facilmente sensibilizado à ovalbumina (OVA) e que desenvolve uma resposta imune mediada por células Th2, caracterizada por eosinofilia e produção de anticorpo IgE antígeno-específico após desafio antigênico (Brewer e col., 1999; Whitehead e col., 2003; Zosky e col., 2004; Kumar e col., 2008). O modelo alérgico pulmonar induzido por OVA tem sido extensamente utilizado para avaliações pré-clínicas de potenciais alvos terapêuticos para asma (Kumar e col., 2008). Entre os novos agentes anti-inflamatórios investigados neste modelo, estão os inibidores de fosfodiesterase 4 (Kanehiro e col., 2001; Kumar e col., 2003; Deng e col., 2006), com grande potencial para o tratamento da asma; inibidores da síntese de mediadores inflamatórios e/ou seus antagonistas funcionais (Oh e col., 2002; Henderson e col., 2006); antagonistas de receptores críticos na indução da inflamação alérgica, por exemplo o CCR3 (Wegmann e col., 2007); anticorpos contra diversas citocinas (Ma e col., 2007, 2007); e modificadores da resposta imune não antígeno-específica (Quarcoo e col., 2004).

#### **1.4. Eosinófilos e asma**

Os eosinófilos estão envolvidos na patogênese da asma sendo que a presença destas células na luz das vias aéreas e no tecido pulmonar é considerada uma característica marcante desta doença (Holgate, 2008). Pacientes asmáticos têm número elevado de eosinófilos no sangue e no lavado broncoalveolar (LBA), e infiltrado inflamatório pulmonar rico em células ativadas, como mastócitos, monócitos, linfócitos e, principalmente, eosinófilos (Sato e col., 1999). A importância dos eosinófilos na asma tem sido enfatizada pelos achados que correlacionam o grau de eosinofilia no sangue e no LBA com o grau de hiperreatividade brônquica e gravidade da doença (Gonzalo e col., 1998; Sato e col., 1999; Trivedi e Lloyd, 2007; Holgate, 2008).

Os eosinófilos, descrito inicialmente por Paul Erlich (1879), são células bilobadas, com grânulos citoplasmáticos contendo proteínas catiônicas, como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica de eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) e a peroxidase de eosinófilo (EPO), todas capazes de exercer ações tóxicas (Trivedi e Lloyd, 2007). Residem predominantemente no trato gastrointestinal, e representam somente 1-3% dos leucócitos circulantes. São originados da linhagem hematopoiética progenitora CD34<sup>+</sup>, e sua diferenciação é induzida por ações coordenadas pelos fatores de transcrição GATA1, PU.1 e C/EBP, e pelas citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF, onde o fator de transcrição GATA1 e a citocina IL-5 são seletivos para o desenvolvimento do eosinófilo (Trivedi e Lloyd, 2007).

A produção de eosinófilo na medula óssea é uma característica importante da asma. O número de progenitores eosinofílicos CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>IL-5R $\alpha$  estão aumentados no sangue periférico de asmáticos atópicos sob desafio alergênico (Sehmi e col., 1996, 1997), e também em modelos murinos de inflamação alérgica pulmonar (Johansson e col., 2004). Assim, sob desafio alergênico, sinais emitidos pela mucosa brônquica são transmitidos para a medula óssea, para aumentar o "pool" de eosinófilos maduros disponíveis para mobilização e recrutamento, onde a citocina IL-5 em sinergismo com a eotaxina desempenham um papel primordial neste fenômeno (Trivedi e Lloyd, 2007).

O tráfego de eosinófilos da medula óssea para o sítio inflamado é dependente de ações coordenadas de diversas citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Dentre as citocinas, a IL-5 é a mais específica para a linhagem eosinofílica sendo responsável por "estimular" o eosinófilo, induzindo o crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência desses leucócitos (Sanderson, 1992; Collins e col., 1995; Rothenberg e Hogan, 2006; Barnes, 2008). Esta atua em sinergismo com a eotaxina no recrutamento de eosinófilos para o pulmão (Bandeira-Melo e col., 2001). A eotaxina 1 (CCL11) é produzida principalmente pelas células epiteliais brônquicas (Gutierrez-Ramos e col., 1999) em resposta à IL-4 e IL-13 (Blanchard e col., 2005), e atua sinergisticamente com a IL-5, derivada de células Th2, promovendo o recrutamento seletivo de eosinófilo para o pulmão desafiado pelo alérgeno (Simson e Foster, 2000; Pope e col., 2001). A produção de eotaxina é maior em modelos murinos sob desafio alérgico (Gonzalo e col., 1998) e em pacientes asmáticos (Zeibecoglou e col., 1999). A eotaxina (CCL11/eotaxina 1), dentre as três variações identificadas (CCL24/eotaxina 2; CCL26/eotaxina 3), atua exclusivamente sobre os receptores de membrana CCR3 (Ponath e col., 1996; Daugherty e col., 1996), que, embora expresso constitutivamente em eosinófilos, sua expressão é aumentada em resposta ao estímulo inflamatório alérgico (Sehmi e col., 2003). A ligação da eotaxina ao seu receptor desencadeia uma série de eventos incluindo mobilização de cálcio, *upregulation* de CD11b, ativação da proteína MAP-kinase e ERK2, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), polimerização de actina e rápida alteração na forma, que está associada à quimiotaxia e secreção de grânulos (Conroy e Williams, 2001; Pease e Williams, 2001).

Por ações coordenadas, a IL-5, em conjunto com a IL-3, GM-CSF, PAF (Fator ativador de plaquetas) e C5a (Fator 5a do sistema complemento), atuam ativando o eosinófilo circulante, conferindo-lhe capacidade de migrar em direção ao gradiente de concentração de eotaxina, produzida em resposta ao estímulo alérgico pulmonar pelas células epiteliais brônquicas (Sehmi e col., 2003; Rosenberg e col., 2007).

O recrutamento de eosinófilos para o tecido inflamado é complexo, sendo regulado por vários fatores, incluindo citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), quimiocinas (eotaxinas, RANTES e MCP-1 $\alpha$ ), NO e moléculas de adesão (integrinas  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 7) (Gonlugur e Efeoglu, 2004; Rothenberg e Hogan, 2006). O recrutamento de eosinófilos para o tecido

extravascular durante os episódios de asma e inflamação alérgica é mediado por interações adesivas entre os eosinófilos circulantes e a célula endotelial vascular (Bochner, 1997; Rosenberg e col., 2007). Durante o episódio asmático, o TNF- $\alpha$ , produzido principalmente pela ativação de macrófagos alveolares, é liberado no sítio inflamado e contribui para o recrutamento de leucócitos pela indução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (Broide e Sriramarao, 2001). O contato do eosinófilo com a célula endotelial ocorre inicialmente pela ligação da PSGL-1 (glicoproteína ligante de P-selectina 1) do eosinófilo à molécula de adesão P-selectina no endotélio (Gonzalo e col., 1996), favorecendo o rolamento sobre as vênulas pós-capilares inflamadas (Broide, 2008). De forma transitória, o fenômeno de rolamento favorece a interação das integrinas Mac-1 (CD11b/CD18;  $\alpha_x\beta_2$ ) e VLA-4 (CD49d/CD29;  $\alpha_4\beta_1$ ), que se ligam respectivamente a ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular-1), mediando a adesão firme do eosinófilo ao endotélio. As integrinas ICAM-1 e VCAM-1 são responsáveis pela interação célula-célula presentes na superfície das células endoteliais (Lampinen e col, 2004; Gonlugur e Efeoglu, 2004), e também podem se ligar a componentes da matriz extracelular, como a fibronectina e o fibrinogênio (Zhang e Plow, 1996; Conran e col., 2001). Estas interações permitem que o eosinófilo migre para o espaço extravascular, alcançando o pulmão em resposta ao estímulo alérgico.

Com o recrutamento inicial e consequente acúmulo nas vias aeríferas inflamadas, os eosinófilos passam a produzir citocinas pró-inflamatórias Th2 como a IL-4 (Nonaka e col., 1995) e IL-13 (Woerly e col., 2002), que estimulam de modo potente a produção de RANTES e MCP-1 (Li e col., 1999), ampliando o recrutamento de eosinófilos, perpetuando a resposta inflamatória alérgica. Sob ação de quimiocinas (eotaxinas, RANTES, MPC-1) e mediadores lipídicos (LTB<sub>4</sub>, PAF, PGD<sub>2</sub>, CysLT1) gerados no microambiente inflamado na mucosa brônquica, estes leucócitos são ativados, resultando na sua desgranulação gradual, permitindo a liberação parcial e seletiva de grânulos citotóxicos, o qual contribui para o desenvolvimento de danos epiteliais, hiperreatividade e remodelamento tecidual das vias aeríferas (Minshall e col., 1997).

Evidências vêm mostrando que o eosinófilo tem um amplo espectro de atuação, além das funções básicas dos granulócitos. É considerado um importante alvo terapêutico



no manejo da asma, devido aos seus múltiplos papéis como imunomodulador, e à sua participação na perpetuação da inflamação, indução da hiperreatividade e remodelamento tecidual das vias aéreas (Trivedi e Lloyd, 2007; Wegmann, 2011).

### **1.5. Sinalização NO-CGs-GMPc na asma**

Como abordado anteriormente, muitos eventos estão envolvidos na patogênese da inflamação alérgica pulmonar. Uma quantidade considerável de evidências também apontam o óxido nítrico (NO) como um mediador importante nestes mecanismos (Ghosh e Erzurum, 2011).

O NO é formado pela oxidação do grupo guanidínico do aminoácido L-arginina (L-arg) por cinco elétrons ( $e^-$ ), gerando NO• e L-citrulina (Moncada e Higgs, 1993). A reação é catalizada pela enzima sintase do NO (NOS) com a ajuda de diversos co-fatores, incluindo flavonas (FAD, FMN), tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) e NADPH. A NOS existe em três isoformas sendo todas esteroespecíficas e ativas como homodímeros (Saleh e col., 1998). A NOS neuronal (nNOS e/ou NOS1: 155 kDa) e NOS endotelial (eNOS e/ou NOS3: 125 kDa), originalmente identificadas em células neuronais e endoteliais, respectivamente, necessitam do aumento intracelular de cálcio para que a ligação  $Ca^{2+}$ -calmodulina ocorra e ative a enzima, levando à produção de níveis picomolares de NO (Stuehr, 1999). A NOS 2 induzível (iNOS: 125 kDa) é induzida em diversos tipos celulares e possui a calmodulina como uma subunidade, favorecendo a produção em níveis nanomolares de NO na presença de níveis basais de cálcio intracelular (Stuehr, 1999). Todas as isoformas estão presentes no pulmão (Kobzik e col., 1997; Sanders, 1999).

O NO produzido nos pulmões é um importante regulador fisiológico, onde mantém o tônus das vias aeríferas e da vasculatura pulmonar, secreção de mucina, clearance mucociliar e manutenção do sistema imune (Nathan e Xie, 1994; Stuehr, 1999; Uetani e col., 2000; Zheng e col., 2003).

Evidências mostram que o NO exerce efeitos prejudiciais na inflamação das vias aeríferas através da formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Ricciardolo e col.,

1996; Elias e col., 1999). Estes efeitos são geralmente mediados pela nitração protéica em resíduos de tirosina, S-nitrosilação, interação com metais de transição, radicais livres e lipídeos (Ghosh e Erzurum, 2011).

Nas últimas duas décadas, numerosos estudos sobre a asma revelaram que em adição ao estresse oxidativo há paralelamente o fenômeno de estresse nitrativo, relacionado ao aumento de NO e produtos de suas reações (Sugiura e Ichinose, 2011). Os níveis de NO estão aumentados no ar exalado de indivíduos asmáticos comparados a indivíduos saudáveis (Comhair e col., 2000). Em indivíduos asmáticos, os níveis de NO são três vezes mais elevados acima da concentração normal de NO nas vias aeríferas inferiores e na respiração exalada (Dweik e col., 2001; Comhair e col., 2000; Guo e col., 2000; Persson e col., 1994). Níveis elevados de NO exalado são inversamente correlacionados com os parâmetros de fluxo de ar em pacientes asmáticos (Kharitonov e col., 1994; Khatri e col., 2001; Massaro e col., 1996), e são maiores durante a respostas asmática tardia após desafio alérgico (Dweik e col., 2001).

Estudo recente realizado por Yamamoto e colaboradores (2011) conduzido em pacientes com asma grave correlacionou positivamente a gravidade da asma à expressão aumentada de iNOS no epitélio pulmonar, que por sua vez está diretamente relacionada ao NO exalado (FeNO), nitrotirosina e inflamação eosinofílica.

Estudo em modelo murino de asma alérgica avaliou mudanças sequenciais na produção do estresse oxidativo pulmonar (medido pela relação glutatona reduzida/glutaciona oxidada) e nos níveis de EROs no epitélio brônquico, mostrando-se que os dois parâmetros foram imediatamente aumentados logo após o desafio antigênico (primeiro dia), retornando rapidamente aos níveis basais em dois dias (Park e col., 2009). Estes eventos precedem os outros fenótipos asmáticos, como o infiltrado de células inflamatórias (pico máximo em três dias após o desafio) e hiperreatividade das vias aeríferas. De acordo com este estudo, o estresse oxidativo e a geração de EROs contribuem diretamente para a indução da inflamação alérgica pulmonar.

Em humanos, a concentração elevada de NO no ar exalado de pacientes asmáticos está estreitamente relacionada ao aumento da transcrição gênica da iNOS (Guo e col.,

2000). A iNOS está expressa em epitélio saudável das vias aeríferas (Dweik e col., 1998; Guo e col., 1995, 1997), onde os altos níveis de NO parecem estar envolvidos na resposta imune inata (Zheng e col., 2003). A expressão protéica e atividade da iNOS são maiores nas vias aeríferas de asmáticos (Guo e col., 2000; Donnelly e Barnes, 2002; Ricciardolo e col., 2004). Estudos utilizando o inibidor não-seletivo de NOS, L-NAME, indicam que o NO favorece a migração de eosinófilos *in vivo* e *in vitro* em modelo de pleurisia (induzida por bradicinina, PAF, LPS e carragenina) (Ferreira e col., 1996), e em modelo *in vivo* de asma alérgica em ratos, (Ferreira e col., 1998). Além disso, a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos (isolados) de ratos foi inibida na ausência de NO, pelo L-NAME, ou pela inibição da GCs com ODQ, fenômenos revertidos pelo SNP (doador de NO), e também pelo dibutiril-GMPc, composto análogo do GMPc (Zanardo e col., 1997).

A inibição do NO derivado de iNOS atenua a broncoconstrição induzida por antígeno, inflamação, e remodelamento tecidual, reduzindo ambos os depósitos de fibras de colágeno e elásticas em modelo de asma em cobaias (Prado e col., 2006). A expressão gênica da iNOS está significativamente elevada em nível de transcrição (Xie e col., 1993; Taylor e col., 1998; Uetani e col., 2000; Zheng e col., 2003). O sinal gerado pelo interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) é o primeiro evento molecular requisitado para a expressão da iNOS em epitélio humano (Guo e col., 1997; Chu e col., 1998). O IFN- $\gamma$  desencadeia a expressão de iNOS pela combinação da ativação da enzima transdutora de sinal Janus quinase (JAK), o ativador de transcrição 1 (STAT-1), e ativação dos fatores nucleares NF- $\kappa$ B e AP-1 (Taylor e col., 1998; Marks-Konczalik e col., 1998; Stuehr, 1999).

O NO exerce seus efeitos em sistemas biológicos atuando por vias dependentes e independentes de GMPc. A via dependente de GMPc é iniciada a partir da ligação do NO à enzima receptora guanilil ciclase solúvel (GCs), que então ativada, converte o nucleotídeo guanosina-5'-trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), elevando os níveis intracelulares deste segundo mensageiro, responsável pela sinalização *downstream* (Francis e col., 2010). Acredita-se que esta via produza os efeitos considerados benéficos do NO (Lucas e col., 2000).

Estudos têm mostrado que a expressão e a atividade da GCs estão reduzidas na asma experimental, fenômeno que contribui para a hiperreatividade brônquica em murinos

(Papapetropoulos e col., 2006). Os níveis celulares de RNAm para GCs são regulados transcricionalmente em culturas celulares por estímulos inflamatórios, como lipopolissacarídeo (LPS), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ou por uma mistura de citocinas. Supõe-se que altos níveis de citocinas inflamatórias nas vias aeríferas asmáticas contribuam para a redução da expressão da GCs (Takata e col., 2001; Papapetropoulos e col., 2006). Estudos identificaram uma interação NO-cisteína, além da clássica ativação NO-grupo heme férrico, que é importante para a ativação da GCs. A formação de um suposto aduto tiol-NO aparentemente permite a ativação máxima da GCs. Além disso, sob estresse oxidativo, o grupo tiol pode ser oxidado, e prevenir a ligação do NO e retardar a ativação da GCs (Fernhoff e col., 2009). Assim, o estresse oxidativo nas vias aeríferas asmáticas pode contribuir para a broncodilatação deficiente secundária à redução da expressão da GCs e também pela oxidação da cisteína que anula a ativação máxima da GCs via interação NO-cisteína (Fernhoff e col., 2009).

### **1.6. Guanilil ciclase solúvel: estrutura e ativação**

A GCs é uma enzima transdutora de sinal amplamente distribuída, que em resposta a diversos estímulos celulares converte GTP no segundo mensageiro GMPc. Os efeitos biológicos do GMPc são mediados por três principais efetores intracelulares a saber: proteínas quinase-I e -II dependentes de GMPc, canais iônicos acoplados ao GMPc e fosfodiesterases (PDEs) (Beavo, 1995; Francis e col., 2010; Hofmann e col., 2006). A degradação de GMPc é catalizada por diferentes famílias de PDEs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 (Beavo, 1995; Francis e col., 2010).

A GCs, tipicamente encontrada como heterodímero, é constituída de uma sub-unidade  $\alpha$  maior e uma sub-unidade  $\beta$  heme-ligante menor, embora possa ser encontrada como homodímero (Zabel e col., 1999). Em humanos são indentificados quatro tipos de sub-unidade da GCs:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , dos quais os heterodímeros  $\alpha_1/\beta_1$  e  $\alpha_2/\beta_1$  são os mais bem caracterizados (Zabel e col., 1998; Mayer e Koesling, 2001). A sub-unidade  $\beta$ , com 619 resíduos, contém uma porção domínio heme-ligante amino-terminal, com aproximadamente 200 resíduos de comprimento (Iyer e col., 2003; Nioche e col., 2004;

Pellicena e col., 2004). O grupo heme prostético está posicionado no domínio ligante-heme via interação com a histidina-105 axial e aos resíduos ancoradouros tirosina-135, serina-137 e arginina-139 da região heme-propionato (constituindo a sequência Y-x-S-x-R da região heme-ligante) (Wedel e col., 1994; Schmidt e col., 2004). Os domínios catalíticos carbóxi-terminal de ambas as subunidades são orientados no modo cabeça-cauda, e em conjunto formam o centro ativo catalítico da enzima (Tesmer e col., 1997; Sunahara e col., 1998; Hobbs, 2000; Winger e Marletta, 2005).

Um pré-requisito para a ativação da GCs induzida pelo NO é a presença do  $\text{Fe}^{2+}$  (reduzido) no grupamento heme; sua remoção abole qualquer ativação enzimática induzida por NO (Ignarro e col., 1986; Foerster e col., 1996). O ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) central no grupo prostético é coordenado entre os quatro nitrogênios-heme e a histidina-105 ligante axial, e origina um complexo heme histidil penta-coordenado. A ligação do NO neste complexo resulta na formação do complexo intermediário NO-heme-histidina hexa coordenado que rapidamente se decompõe em um complexo heme-nitrosil penta-coordenado. A quebra da ligação heme-histidina é o gatilho molecular que leva a ativação da GCs em 200 vezes (Ignarro e col., 1982; Evgenov e col., 2006).

Endogenamente, mudanças no estado redox da GCs podem ser induzidas por EROs e ERN, como o ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que são gerados em condições de estresse oxidativo (Stasch e col., 2006). Recentemente, mostrou-se que o próprio NO dessensibiliza a GCs por S-nitrosilação, e que, embora consiga restaurar o estado redox do grupo heme para reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ), promove concomitantemente a oxidação das subunidades  $\beta 1$  nos resíduos 78 e 122, enfraquecendo a atividade catalítica via NO (Fernhoff e col., 2012).

Além da remoção do grupamento heme, a oxidação da GCs pode ocorrer por ação de inibidores de sua atividade, como o ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona), NS22028, azul de metileno e ferricianeto, que levam à formação de um estado enzimático insensível ao NO (Kannan e Johnson, 1995; Mayer e col., 1993; Schrammel e col., 1996; Olesen e col., 1998). O ODQ é uma importante ferramenta farmacológica, frequentemente utilizada *in vitro* e *in vivo*, para avaliar os efeitos do estado redox da GCs em condições fisiológicas e patológicas.

A sinalização do NO pode ser comprometida por rotas primárias de ações oxidantes: redução da sua biodisponibilidade, pela interação química do NO com  $\bullet\text{O}_2^-$  (Pryor e Squadrito, 1995; Kodja e Harrison, 1999); oxidação do grupamento tiol da GCs (Sayed e col., 2007; Fernhoff e col., 2009; Maron e col., 2009); e oxidação do grupamento heme férrico (Schrammel e col., 1996; Zhao e col., 2000).

### **1.7. Estimuladores e Ativadores da GCs**

Os compostos estimuladores e ativadores da GCs atuam independentemente do NO. Os estimuladores são heme-dependentes, pois dependem do estado de oxidação reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) do grupo prostético heme para se ligarem, podendo atuar em sinergismo com o NO. Por outro lado, os ativadores da GCs possuem a capacidade de mimetizarem o grupamento heme e assim potencializam a ativação da GCs em seu estado oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Schmidt e col., 2009).

Entre os estimuladores estão os compostos YC-1, CFM-1571, BAY 41-2272, BAY 41-8543 e o BAY 63-2521 (Riociguat) (Stasch e Hobbs, 2009). Os ativadores NO- e heme-independentes da GCs são representados pelos compostos BAY 58-2667 (Cinaciguat), HMR1766 (Ataciguat), S-3448 (Schindler e col., 2006) e mais recentemente, o BAY 60-2770 (Knorr e col., 2008; Schmidt e col., 2009; Jones e col., 2010; Pankey e col., 2011).

O potencial papel terapêutico dos estimuladores e ativadores da GCs tem sido demonstrado em diversos modelos animais de doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, hipertensão pulmonar, insuficiência cardíaca, aterosclerose, restenose e trombose, e, também em doenças não-cardiovasculares, como a disfunção erétil, disfunção miccional, fibrose renal e cirrose hepática (Baracat e col., 2003; Evgenov e col., 2006; Freitas e col., 2007; Stasch e Hobbs, 2009; Schmidt e col., 2009; Báu e col., 2010; Mónica e col., 2011; Leiria e col., 2014).

Recentemente, foi descoberto (Knorr e col., 2008) um análogo químico ao BAY 58-2667, o BAY 60-2770, que é capaz de ativar a GCs independente do NO e do grupamento prostético heme da enzima. Além disso, tem seu efeito potencializado sobre a enzima com

o grupamento heme no estado oxidado (Pankey e col., 2011; Mendes-Silvério e col., 2012). Estudos recentes mostraram efeito anti-inflamatório em modelo de fibrose hepática (Knorr e col. 2008), anti-agregante plaquetário (Mendes-Silvério e col., 2012) e potente ativador da ereção peniana em ratos (Lasker e col., 2013), todos os efeitos dependentes de GMPc.

Com a descoberta dos estimuladores heme- e NO-independentes da GCs (ativadores da GCs), torna-se possível o entendimento da real contribuição da atividade da GCs em condições fisiológicas e patológicas, excluindo os efeitos indiretos do NO. Embora ainda pouco explorado, as evidências mostram que os estimuladores também apresentam efeitos anti-inflamatórios. Ahluwalia e colaboradores (2004) mostraram que o estimulador BAY 41-2272 inibe a expressão da molécula de adesão P-selectina e reduz o recrutamento de leucócitos em camundongos *knockout* para eNOS tratados com IL-1 $\beta$ . Thomazzi e colaboradores (2005) mostraram que a estimulação da GCs pelo BAY 41-2272 inibiu, embora discretamente, a quimiotaxia de eosinófilos humanos *in vitro* frente ao agente quimiotático, fMLP. Os estimuladores também preveniram a diferenciação de fibroblastos pulmonares em miofibroblastos induzida por TGF- $\beta$  (Dunkern e col., 2007). Estudos relataram que a resposta inflamatória pulmonar alérgica em resposta à OVA e ao LPS é acompanhada de redução dos níveis da expressão e transcrição protéica das subunidades da GCs em murinos (Papapetropoulos e col., 2006; Glynos e col., 2007). Coerentemente, a inibição da degradação de GMPc reverteu a inflamação pulmonar alérgica à OVA em cobaias, inibindo o recrutamento de eosinófilos e desenvolvimento da hiperreatividade brônquica (Toward e col., 2004). Estas evidências somadas aos efeitos inibitórios da ativação, adesão e quimiotaxia de eosinófilos dependentes de GMPc (Thomazzi e col., 2004 e 2005; Conran e col., 2001), reforçam o papel protetor e anti-inflamatório da GCs, que surge como um atraente alvo terapêutico na inflamação alérgica pulmonar.

Com base na literatura, nossa hipótese é que a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela OVA em murinos seja modulada negativamente pelo ativador da GCs, BAY 60-2770, com provável inibição da migração de leucócitos *in vivo*, principalmente eosinófilos, para o pulmão inflamado, e paralelamente, inibição da quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos frente à eotaxina por mecanismo dependente de GMPc.





## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

Este projeto teve como objetivo geral investigar os efeitos do ativador NO- e heme-independente da GCs, BAY 60-2770, sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar murina induzida por OVA, e os efeitos sobre a migração de eosinófilos humanos isolados *in vitro*.

### 2.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar os efeitos do tratamento oral crônico com o BAY 60-2770 sobre o perfil celular no LBA, pulmão, sangue circulante e medula óssea em modelo murino de inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA;
2. Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o BAY 60-2770 sobre os níveis séricos de IgE específica à OVA e das citocinas Th<sub>1</sub> (IFN- $\gamma$ ), Th<sub>2</sub> (IL-4, IL-5 e IL-10), TNF- $\alpha$  e eotaxina no LBA;
3. Avaliar os efeitos do tratamento crônico com BAY 60-2770 sobre a expressão da iNOS e das subunidades  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  da GCs no tecido pulmonar;
4. Avaliar os efeitos do BAY 60-2770 sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos isolados induzida por eotaxina (CCL11), na presença e/ou ausência da oxidação da GCs pelo ODQ.



#### 3.1. Animais

No presente estudo utilizou-se camundongos machos da linhagem C57BL6/J, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) - UNICAMP, os quais foram transferidos com quatro semanas de idade para o biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP. Os animais foram mantidos em estantes apropriadas com temperatura controlada em torno de  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob dieta padrão para roedores (AIN-93G, da marca NUVILAB) e água em regime *ad libitum*, e regulação de fotoperíodo em 12 horas claro/escuro. Após seis semanas de idade, os animais foram submetidos aos protocolos experimentais do estudo, todos aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB – UNICAMP sob parecer n° 2622-1 (ANEXO 1).

#### 3.2. Sensibilização ao alérgeno e desafio intranasal

Os animais, após leve anestesia em cuba com isoflurano (Isoforine<sup>®</sup>, Cristália, Brasil), foram sensibilizados nos dias 0 e 7, por injeção subcutânea de 100 µg de ovalbumina (OVA grau V, Sigma<sup>®</sup>) adsorvidos em uma suspensão de 1,9 mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  em 0,4 mL de soro fisiológico. Os desafios alérgicos foram realizados no 14° e 15° dia, duas vezes por dia com intervalos de seis horas entre si, pela instilação intranasal de 50 µL de solução de OVA (0,2 mg/mL) dissolvida em salina. Os protocolos de sensibilização e desafio foram realizados de acordo com Lintomen e colaboradores (2002). A contagem de leucócitos no sangue periférico, lavado bronco-alveolar (LBA), perfusato de medula óssea, coleta de pulmão e soro, foram realizadas 48 horas após o primeiro desafio à OVA.

### **3.3. Lavado broncoalveolar (LBA)**

Os camundongos, anestesiados em cuba saturada com anestésico inalatório (isoflurano), foram submetidos à laparotomia, com auxílio de material cirúrgico (tesouras e pinças), onde a veia cava inferior abdominal foi exposta e puncionada com agulha (25x0,70 mm ou 22G1) acoplada a uma seringa (1 mL). O sangue foi colhido para posterior extração de soro. Os animais foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia.

Após exsanguinação, os animais tiveram sua traquéia exposta e delicadamente canulada com um cateter (24G x ¾"). Em seguida, amarrou-se delicadamente uma linha ao redor da traquéia para que o cateter não se movesse e nem saísse do interior da traquéia. Posteriormente, através da cânula já fixada à traquéia, foram feitas 5 lavagens broncoalveolares com 300 µL de PBS gelado. Ao término do método, recuperava-se um volume aproximado de 1,5 ml de LBA por camundongo. Após a coleta, o LBA foi centrifugado a 4°C (400 g por 10 minutos), o sobrenadante foi coletado e estocado à 80°C. O *pellet* foi ressuspenso em 200 µL de PBS e utilizado para contagem total de células em câmara de Neubauer, para confecção de lâmina em citocentrífuga e para posterior contagem diferencial dos leucócitos. A contagem diferencial foi realizada por contagem de 100 células (em triplicata) por lâmina, diferenciadas em eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares (linfócitos e macrófagos), de acordo com critério morfológicos celulares normais. Os dados foram expressos como nº de leucócitos x 10<sup>6</sup>/mL de LBA.

### **3.4. Perfusato de medula óssea**

Os dois fêmures de cada animal foram retirados com o auxílio de material cirúrgico (pinças e tesouras) e transferidos para uma placa de Petri pequena, contendo 5 mL de PBS. O canal medular de cada osso foi lavado com o PBS contido na placa, utilizando-se uma seringa de 5 mL e uma agulha (25x0,70 mm ou 22G1). Após esse procedimento, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e homogeneizado com uma pipeta Pasteur. As células da medula óssea foram utilizadas para contagem total de células em câmara de Neubauer (com líquido de Turk), para a confecção de lâmina (citocentrífuga) e para posterior contagem diferencial (corante hematológico). A diferenciação celular de

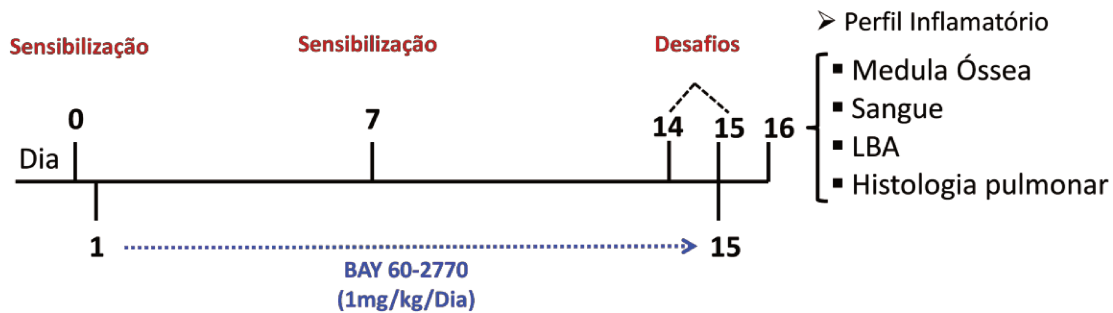
eosinófilos e neutrófilos foi realizada através de coloração específica (corante panótico rápido; Laborclin, Brasil), de acordo com critérios morfológicos celulares normais, quantificando mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados. Foram consideradas como outras células as linhagens monocíticas, linfocíticas e megacariocíticas. O número de leucócitos foi determinado pela contagem de 100 células (em triplicata) por lâmina. Os dados foram expressos como nº de leucócitos x  $10^6/\text{mL}$  de perfusato de medula óssea.

### **3.5. Contagem de leucócitos circulantes**

Os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida o sangue foi coletado da veia cava abdominal com seringa de 1 mL na ausência de anticoagulante. Imediatamente após a coleta, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de sangue foi adicionada à 190  $\mu\text{L}$  de líquido de Turk, para realizar a contagem total de células em câmara de Neubauer. Uma segunda alíquota de sangue (10  $\mu\text{L}$ ) foi utilizada para confecção de lâmina (esfregão), e coradas com corante hematológico (Diff Quick) para posterior contagem diferencial. A quantidade de sangue restante foi centrifugada (1000 x g por 20 minutos); o soro foi coletado e estocado a  $-80^\circ\text{C}$ . O número de leucócitos foi expresso como leucócitos x  $10^5/\text{mL}$  de sangue circulante.

### **3.6. Administração crônica do BAY 60-2770**

O BAY 60-2770 foi veiculado em uma micro-emulsão na proporção de 10 % de Transcutol (Sigma<sup>®</sup>), 20 % de Cremophor (Sigma<sup>®</sup>) e 70 % de água destilada (v/v/v). Foi administrado em dose única diária de 1 mg/kg por gavage (0,2 mL), durante 14 dias seguidos (Knorr e col., 2008), iniciando-se o tratamento no dia 1 após a primeira sensibilização à OVA, seguindo até o 15º dia. Os grupos controles receberam apenas o veículo (micro-emulsão). Veja o esquema a seguir:



### 3.7. Grupos experimentais

Neste estudo foram conduzidos os seguintes grupos experimentais:

- (i) VS: tratamento com Veículo e instilação intranasal com Salina;
- (ii) VO: tratamento com Veículo e desafio intranasal com OVA;
- (iii) BS: tratamento com BAY 60-2770 e instilação intranasal com Salina;
- (iv) BO: tratamento com BAY 60-2770 e desafio intranasal com OVA.

### 3.8. Análise histológica

Os pulmões foram retirados, fixados em uma solução de formalina (10% em PBS) por 24 horas, e desidratados em etanol (70%); e posteriormente embebidos em xilol até a inclusão em parafina. Cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  foram corados com hematoxilina/eosina (corante H/E) para contagem dos eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no tecido. A quantidade de leucócitos no parênquima pulmonar foi determinada ao microscópio, em uma área de 40  $\mu\text{m}^2$  circunjacente aos brônquiólos. Os valores representam a média de 5 bronquíolos examinados de forma aleatória. As imagens representativas foram registradas em aumento de 400x produzida em microscópio óptico (Leica DM5000 B, Germany, QWin Plus software).

### **3.9. Pressão sanguínea sistólica**

A pressão sanguínea arterial sistólica foi monitorada no último dia de tratamento com o BAY 60-2770 pela técnica de *tail-cuff*. Os animais foram colocados em gaiolas aquecidas a temperatura aproximada de 38°C por 20 minutos para provocar dilatação dos vasos caudais. Após este período, os animais foram imobilizados em um contensor (MLA5018 Rodent Restrainer, AD Instrument®). Um manguito junto de um transdutor de pulso conectado ao osciloscópio (NIBP Controller, AD Instruments®, Austrália) foi acoplado a cauda do animal e inflado a 200 mmHg, até o cessamento das pulsações. Em seguida, era desinflado até que se reiniciassem as pulsações, que foram lidas pelo sistema de aquisição de dados LabChart 7 (Power Lab 4/35, AD Instruments®). As leituras foram efetuadas cinco vezes consecutivas, obtendo-se uma média para cada animal. Os animais foram previamente treinados por 4 dias antes das aferições das pressões sanguíneas.

### **3.10. Dosagens séricas e/ou no LBA**

Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  e eotaxina foram quantificadas no sobrenadante do LBA, 48 horas após o 1º desafio alergênico, por imunoensaio enzimático (ELISA) através de kit comercial (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A imunoglobulina-E (IgE) específica a OVA foi quantificada pelo mesmo método, utilizando o kit comercial da marca BioLegends Inc (San Diego, CA, EUA). As placas foram lidas em leitor de ELISA (Hybrid Multi-Mode Microplate Reader Synergy™ H1 BioTek® Instruments, Winooski, VT, EUA).

### **3.11. Western blotting**

O pulmão esquerdo de cada animal foi removido e imediatamente homogeneizado em tampão de extração de proteína (EDTA 200 mM, SDS 10 %, piruvato de sódio 409 mM, fluoreto de sódio 1 M, ortovanadato de sódio 102 mM, Trisma-base pH 7.5), e centrifugado (12000 g, 4°C, 40 minutos). O material insolúvel foi removido. A concentração de proteína da amostra foi determinada pelo método de Bradford e uma

quantidade (50 µg) igual foi adicionada ao tampão Laemmli contendo 100 mM de ditiotreitol. As amostras foram fervidas em banho-maria por 5 minutos e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletrotransferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 60 minutos a 15 V (constante) em dispositivo semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As ligações inespecíficas da membrana foram reduzidas pela pré-incubação da membrana em tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 0.5%, Tris 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 0.02%) *overnight* à 4°C. A detecção foi realizada utilizando anticorpo específico, anticorpo secundário conjugado à HRP, ácido p-cumárico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após incubação de 1 minuto, filmes sensíveis ao raio-x foram expostos a membrana e marcados com sinal quimioluminescente. As subunidades da GCs foram detectadas individualmente, utilizando anticorpo policlonal contra o epítipo da subunidade  $\alpha 1$  (AbCam Technology, Cambridge, Inglaterra, RU), subunidade  $\beta 1$  (NovusBiologicals, Littleton, CO, EUA); e também a detecção das enzimas iNOS (AbCam Technology, Cambridge, Inglaterra) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), esta como proteína constitutiva. Os níveis de proteínas foram normalizados com os níveis de GAPDH. A quantificação foi realizada por densitometria, utilizando o software de imagem *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, MD). Os resultados foram representados como porcentagem em relação à expressão da proteína controle.

### **3.12. Isolamento de eosinófilo humano**

O sangue venoso foi coletado de indivíduos saudáveis, com eosinofilia mediana, sem histórico de uso prévio de medicamentos (anti-inflamatórios, anti-alérgicos e/ou corticosteróides) por duas semanas, com consentimento escrito aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o parecer substanciado nº 44347.

Para cada experimento, foram coletados 60-80 mL de sangue em anticoagulante citrato de sódio 3,13% (1:9, v/v), e diluídos em PBS (1:1; pH 7.2-7.4). Aliquotas de 35 mL de sangue diluído foram suavemente colocadas sobre 15 mL de solução isotônica de Percoll (9,5 mL de Percoll, 4,0 mL de água e 1,5 mL de solução salina de HANKS concentrado



10x; densidade  $1,082 \pm 0,005$  g/mL; pH 7,4; 340 mOs/kg H<sub>2</sub>O de osmolaridade; Sigma Chem. Co., EUA) em tubos plásticos de 50 mL. Após centrifugação (23 minutos, 1000 g, 4°C), a camada de células mononucleares foi descartada, e o *pellet* contendo eritrócitos, neutrófilos e eosinófilos foi aspirado e transferido para outro tubo. Os eritrócitos foram lisados (13 minutos, 0°C) por adição de 5 volumes de solução isotônica gelada de cloridrato de amônia (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM e EDTA 0,1 mM) para 1 volume do *pellet*. Após a lise, a suspensão celular foi centrifugada (10 minutos, 500 g, 4°C) e o *pellet* resultante foi lavado 1x (10 minutos, 400 g, 4°C) em PBS. Em seguida, foi feita a contagem de células (líquido de Turk), em câmara de Neubauer.

### **3.13. Separação imunomagnética de eosinófilos**

Os eosinófilos foram separados da população de granulócitos (neutrófilos + eosinófilos) pelo método imunomagnético descrito por Hansel e colaboradores (1991), utilizando o sistema magnético de separação celular (MACS; Miltenyi Biotec, Alemanha; e Becton-Dickinson, Reino Unido). Inicialmente a coluna foi lavada 4x com PBS/BSA 0.5% e, posteriormente, incubada com PBS/BSA 0.5% à temperatura ambiente por 1 hora. Imediatamente antes do uso, a coluna foi resfriada por meio de 4 lavagens com PBS/BSA 0.5% gelado. A mistura de neutrófilos/eosinófilos (granulócitos) foi incubada com microbeads revestidos com anticorpo anti-CD16, por 30 minutos (6-12°C, 32 µL microbeads/5x10<sup>7</sup> células). PBS/BSA gelado (q.s.p. 1 mL) foi então adicionado à suspensão de células, a qual foi transferida para o alto da coluna, sob campo magnético. Após aplicarmos a suspensão celular na coluna, mais 3 volumes (1 mL) de tampão PBS/BSA foram passados pela mesma. As células CD16+ (neutrófilos) permaneceram presas à coluna, ao passo que as células CD16- (eosinófilos) foram coletadas (volume de eluição de 30 mL). As células CD16- foram centrifugadas (10 minutos; 500 g; 4°C) e em seguida, ressuspensas em meio de Eagle (MEM-minimum essential media; pH 7.2). A determinação total de células foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer, obtendo o n° de células x 10<sup>6</sup>/mL. As lâminas foram preparadas na citocentrífuga (10 minutos, 2x10<sup>6</sup> céls/mL, 100 µl, 1800 g), e coradas com hematoxilina-eosina para determinação diferencial

em microscópio óptico. As células foram ajustadas na concentração desejada para cada ensaio.

### **3.14. Ensaio de quimiotaxia**

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados em câmara de microquimiotaxia com 48 poços (Richards e McCullough, 1984). Aliquotas de 50 µl da suspensão de eosinófilos ( $4 \times 10^6$  células/mL em MEM) foram colocadas no compartimento superior da câmara e 27 µL do agente quimiotático (eotaxina, 300 ng/mL) em estudo colocados no compartimento inferior. Os compartimentos foram separados com filtro de polycarbonato (5 µm/25x80mm, GE Water & Process Technologies; EUA). A migração espontânea foi verificada substituindo-se os agentes quimiotáticos por 27 µL de MEM. Após incubação por 1 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (ar úmido), os filtros foram fixados, corados (Panótico Rápido LB, Laborclin, Brasil) e colocados sobre lâminas de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o n° de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão (100x). Em cada experimento, as amostras foram aplicadas em triplicata.

Inicialmente, foram realizadas curvas concentração-resposta, onde os eosinófilos ( $4 \times 10^6$  cél/mL) foram previamente incubados (à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e ar úmido) por 30 minutos com concentrações crescentes do ativador BAY 60-2770 (1-10 µM), então dispensados no compartimento superior da câmara, e deixados migrar por 1 hora em direção a eotaxina. Como controle, foram ensaiadas amostras com a respectiva concentração do veículo (DMSO 0.01-0.07%). Em outros experimentos foram realizadas curvas concentração-resposta na presença do agente oxidante, ODQ (1-10 µM), por 40 minutos antes da migração por 1 hora à eotaxina (300 ng/mL).

Após estabelecer os perfis individuais de migração na presença do BAY 60-2770, e do ODQ, realizamos os ensaios adicionais de quimiotaxia onde os eosinófilos foram incubados com ODQ (10 µM, 10 minutos) e em seguida com concentrações crescentes do BAY 60-2770 (1-5 µM; 30 minutos). As suspensões celulares foram deixadas a migrar na câmara de quimiotaxia em direção à eotaxina, como descrito anteriormente.

### **3.15. Ensaio de viabilidade celular (redução do MTT)**

A viabilidade celular na presença do BAY 60-2770 foi avaliada pela capacidade dos eosinófilos em reduzir o composto MTT (sal de tetrazólio; brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), no produto cromogênico formazan (Mosmann, 1983). Apenas células vivas, viáveis, são capazes de reduzir o MTT em formazan por desidrogenases mitocondriais, sendo a produção de formazan proporcional a viabilidade celular.

Os eosinófilos, resuspenso em MEM, foram submetidos à pré-incubação com o BAY 60-2770 (1-10  $\mu$ M) por 90 minutos nas mesmas condições realizadas nos ensaios de quimiotaxia. Em seguida, a suspensão celular de eosinófilos (100  $\mu$ L;  $4 \times 10^6$  cél/mL), tratada ou não, e MTT (10  $\mu$ L/poço, 5 mg/mL em PBS) foram adicionados em triplicata à placa de 96 poços, e deixados a incubar por 3 horas, à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação, 100  $\mu$ L de SDS (10% em HCl 0.01M) foram adicionados a cada poço por 4 horas à 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. Em seguida, a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, em leitor de ELISA (Hybrid Multi-Mode Microplate Reader Synergy™ H1 BioTek® Instruments, Winooski, VT, EUA).

### **3.16. Extração de GMPc de eosinófilos humanos isolados**

Os eosinófilos foram resuspenso em PBS, na concentração de  $1 \times 10^7$  cel/mL, e incubados por 30 minutos com o inibidor inespecífico de fosfodiesterase 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 2 mM), em temperatura ambiente. Afim de mimetizar as condições do ensaio de quimiotaxia, a suspensão celular foi tratada com o BAY 60-2770 (1-10  $\mu$ M) por 90 minutos (37°C, CO<sub>2</sub> 5%, ambiente úmido), na ausência e/ou presença de ODQ (10  $\mu$ M). Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de etanol absoluto acidificado (67%, v/v) e as amostras vigorosamente agitadas por 30 segundos. As amostras celulares foram então incubadas no gelo por 30 minutos, antes da centrifugação à 4000 g, por 30 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e separados, e os precipitados foram lavados com 0,5 mL de etanol acidificado (67%, v/v) antes da centrifugação seguinte à 14000 g por 5 minutos, em temperatura ambiente. Os sobrenadantes deste lavado foram então adicionados aos sobrenadantes do primeiro lavado e as amostras foram secadas (55-60°C, jato de

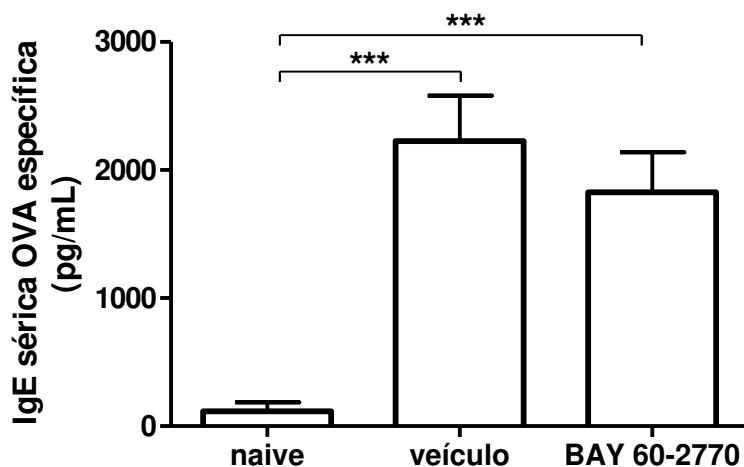
nitrogênio) e armazenadas à 20°C até a quantificação de GMPc, utilizando kit comercial (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, MI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.17. Análise Estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) para  $n$  experimentos. Para a comparação entre dois grupos de dados foi realizado o teste  $t$  de Student. Para comparações de amostras múltiplas, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Tukey. Foram consideradas diferenças significantes valores de  $p < 0,05$ .

### 4.1. Níveis de IgE sérica específica à OVA

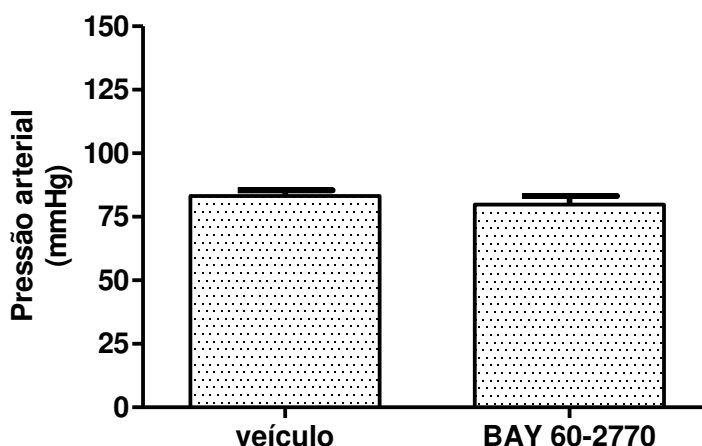
Os níveis de IgE específicos à OVA foram quantificados para comprovar a eficácia do método de sensibilização antigênica e confirmar a indução da resposta imune Th2 desejada no estudo. A **Figura 1** mostra os níveis séricos médios de imunoglobulina E (IgE) específica à OVA quantificados 48 horas após o primeiro desafio. Constatamos que os animais que receberam injeção subcutânea de OVA foram efetivamente sensibilizados e produziram IgE OVA específica, como observado nos grupos veículo ( $2227 \pm 355$  pg/mL) e grupo BAY 60-2770 ( $1826 \pm 312$  pg/mL). Ambos apresentaram valores médios significativamente maiores ( $p < 0.001$ ) quando comparados com o grupo controle *naive*, não sensibilizado ( $115 \pm 70$  pg/mL). O tratamento crônico com o BAY 60-2770 não alterou significativamente a produção de IgE ( $1826 \pm 312$  pg/mL) quando comparado ao grupo veículo.



**Figura 1. Níveis de IgE sérica específica à OVA.** A quantificação de IgE sérica específica a OVA foi determinada em soro colhido 48 horas após o primeiro desafio a OVA, dos animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo, animais sensibilizados a OVA e tratados com BAY 60-2770 ( $n=20$ ) e animais naive controle, do mesmo lote, não sensibilizados a OVA ( $n=5$ ). Os dados foram expressos em pg/mL de soro para  $n=5-20$ . \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado ao grupo naive.

#### 4.2. Pressão arterial caudal

A pressão sanguínea sistólica foi aferida no último dia de administração da droga (14º dia). Como mostrado na **Figura 2**, o tratamento crônico não resultou em alteração no perfil de pressão sanguínea sistólica quando comparamos as médias dos grupos de animais tratados com BAY 60-2770 ( $79.9 \pm 3.3$  mmHg) com os animais controles tratados com veículo ( $83.2 \pm 2.3$  mmHg).



**Figura 2.** Pressão arterial após tratamento crônico com o BAY 60-2770. A pressão sanguínea sistólica foi quantificada pelo método *tail cuff* no 14º dia de tratamento crônico (1 mg/Kg/14 dias) com o BAY 60-2770 e comparado com o grupo controle que recebeu apenas o veículo. A pressão sanguínea sistólica foi expressa em mmHg para  $n=11-12$ .

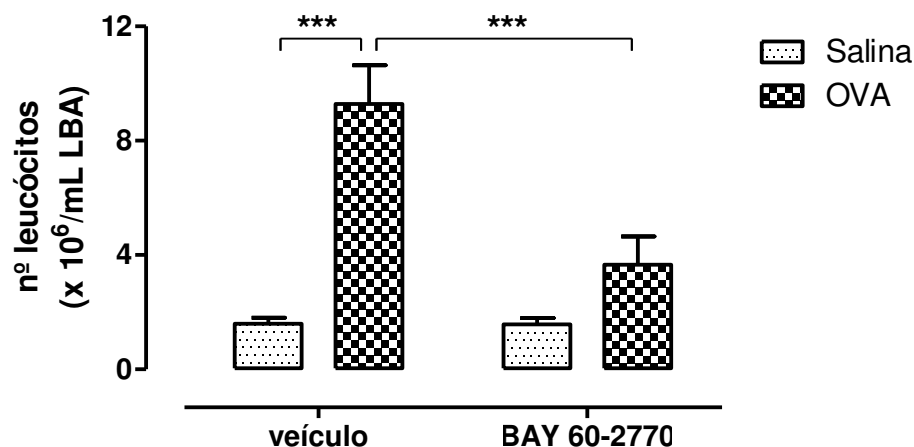
#### 4.3. Efeitos do BAY 60-2770 sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar à OVA

A inflamação pulmonar alérgica foi quantificada à partir da contagem de leucócitos totais (**Figura 3**) e diferenciais (**Figura 4**) no LBA. Pela contagem diferencial caracterizamos a resposta inflamatória como sendo alérgica devido à marcante presença de eosinófilos no LBA, validando nosso modelo.

#### 4.3.1. Número de leucócitos totais no LBA

A **Figura 3** mostra um aumento significativo do infiltrado de leucócitos 48 horas após o desafio intranasal a OVA ( $p < 0,001$ ) comparado ao grupo instilado com salina.

O tratamento crônico com o BAY 60-2770 (BO) reduziu significativamente o infiltrado de leucócitos ( $p < 0,001$ ) comparado com o grupo veículo desafiado à OVA (VO). O grupo controle (BS) tratado com BAY 60-2770 instilado com salina apresentou o mesmo perfil leucocitário do grupo controle veículo instilado com salina (VS).



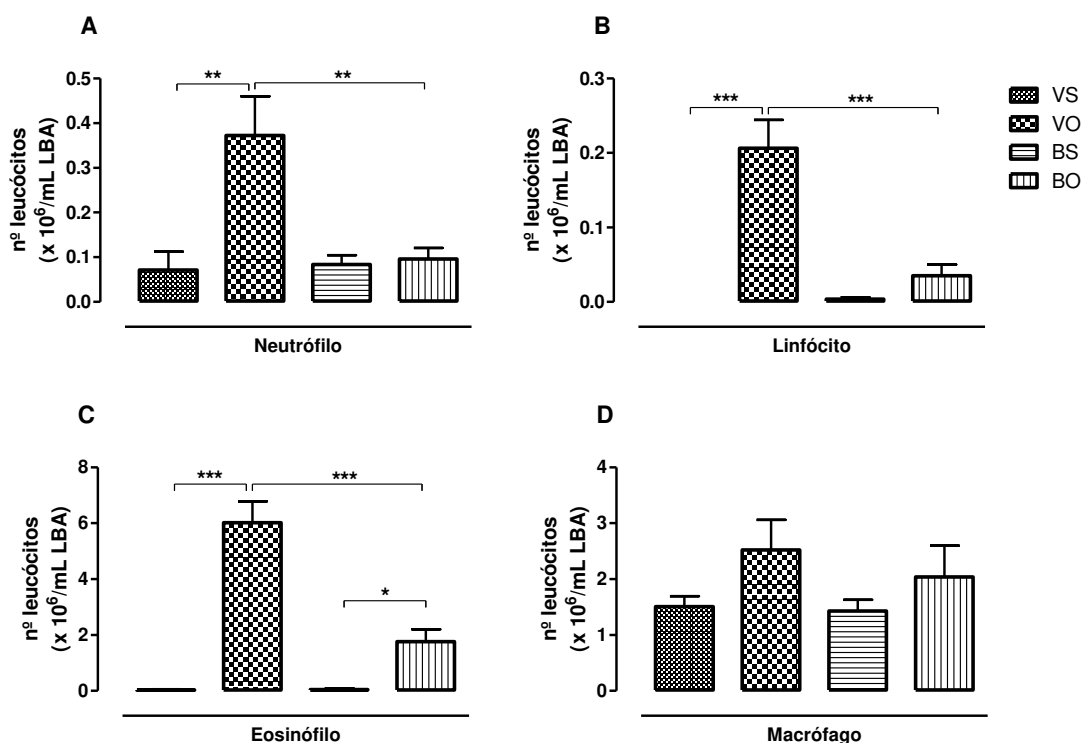
**Figura 3.** *Efeito do tratamento crônico com BAY 60-2770 no infiltrado de leucócitos totais no lavado broncoalveolar (LBA).* As contagens de leucócitos totais foram realizadas no LBA dos animais que receberam o BAY 60-2770 (1mg/Kg/14 dias) ou seu veículo, que foram instilados com salina e/ou desafiados com OVA 48 horas após o primeiro desafio. Dados foram expressos como leucócitos  $\times 10^6$  /mL de LBA e apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n=7-8$  (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

#### 4.3.2. Número diferencial de leucócitos no LBA

A **Figura 4** mostra os efeitos do tratamento crônico com BAY 60-2770 no perfil de células inflamatórias infiltradas no LBA, com ênfase no infiltrado de eosinófilos.

O desafio alérgico à OVA induziu o recrutamento de neutrófilos (**Painel A**;  $p < 0,01$ ), linfócitos (**Painel B**;  $p < 0,001$ ) e principalmente eosinófilos (**Painel C**;  $p < 0,001$ )

no grupo VO, comparado com o grupo não desafiado (tratado com veículo instilado com salina - VS). O tratamento crônico com o BAY 60-2770 (grupo BO) reduziu significativamente o número de eosinófilos ( $p<0,001$ ), neutrófilos ( $p<0,01$ ) e linfócitos ( $p<0,001$ ) após o desafio alérgico à OVA, quando comparados com o grupo VO. O número de macrófagos não foi significativamente alterado entre os grupos (**Painel D**).



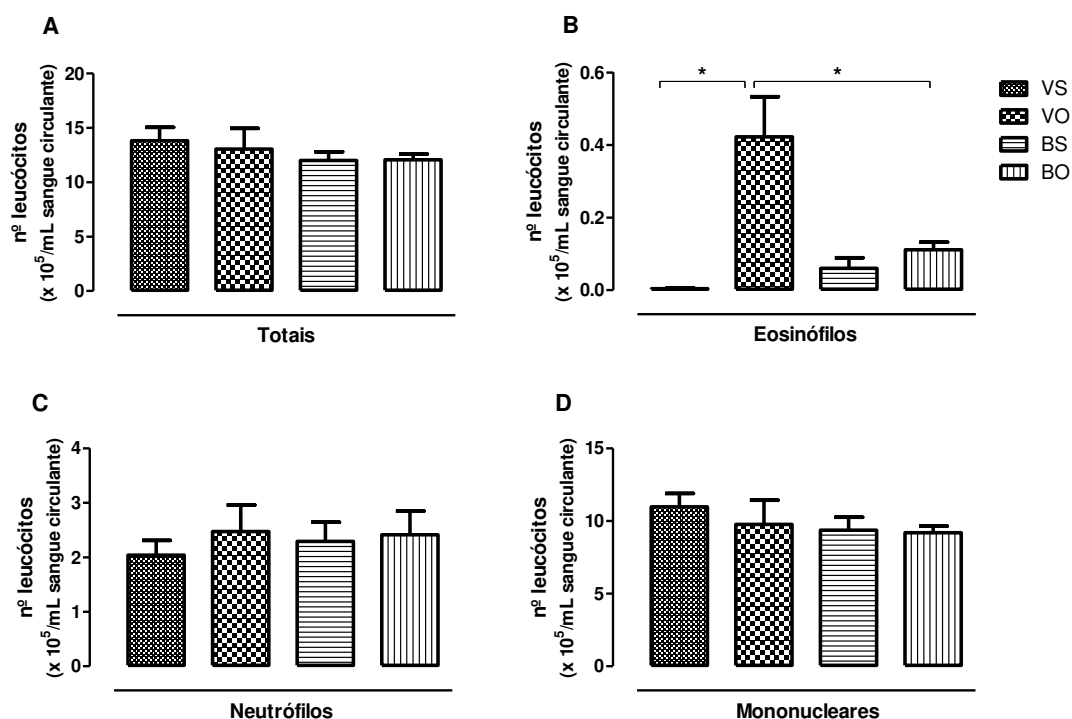
**Figura 4. Efeito do tratamento crônico com o BAY 60-2770 sobre o perfil de células inflamatórias no LBA 48 horas após desafio à OVA.** A contagem de leucócitos no LBA foi realizada diferenciando-os em eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos. Grupos: VS (Veículo - instilado com Salina), VO (Veículo - desafiado com OVA), BS (BAY 60-2770 - instilado com Salina) e BO (BAY 60-2770 - desafiado com OVA). Os dados foram expressos como nº leucócitos x 10<sup>6</sup>/mL de LBA, apresentados como média ± EPM, para  $n=7-8$  (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

#### 4.3.3. Número de leucócitos no sangue circulante

A contagem de leucócitos no sangue circulante foi realizada principalmente para se avaliar o grau de eosinofilia sanguínea no sangue periférico, 48 horas após o desafio a



OVA. A quantidade total de leucócitos sanguíneos circulantes (**Figura 5A**) não foi alterada após o desafio, mas notou-se um aumento significativo do número de eosinófilos circulantes, como observado no grupo veículo desafiado a OVA ( $p<0,05$ , **Figura 5B**) quando comparado com grupo veículo instilado com salina. O tratamento crônico com o BAY 60-2770 reduziu significativamente a eosinofilia sanguínea, como observado no grupo tratado com BAY 60-2770 desafiado com OVA ( $p<0,05$ , **Figura 5B**) comparado com o grupo veículo desafiado com OVA. Não foram observadas diferenças nos perfis de neutrófilos (**Figura 5C**) e células mononucleares (**Figura 5D**) entre os grupos experimentais.

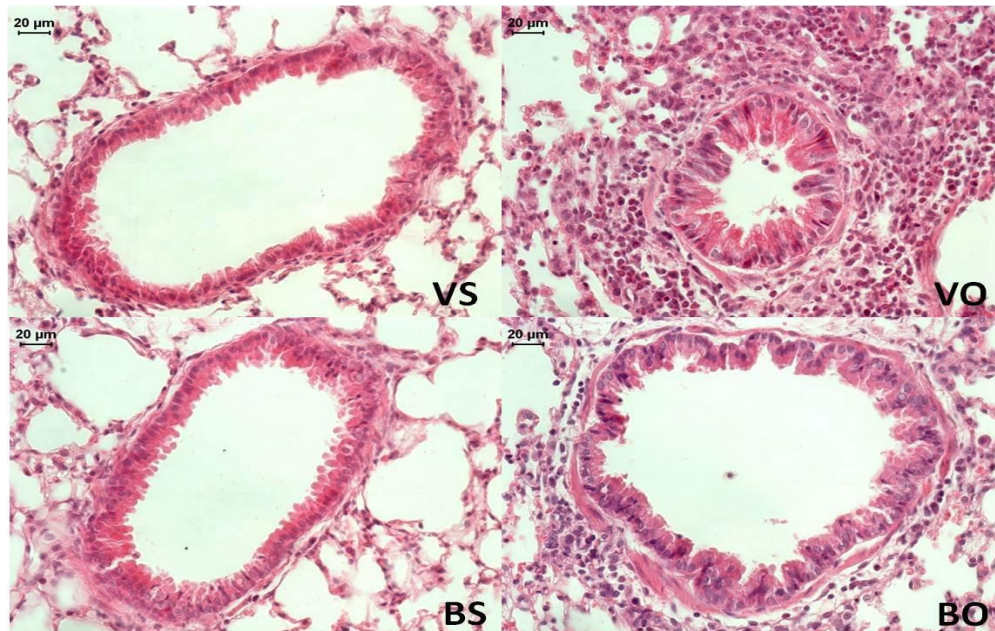
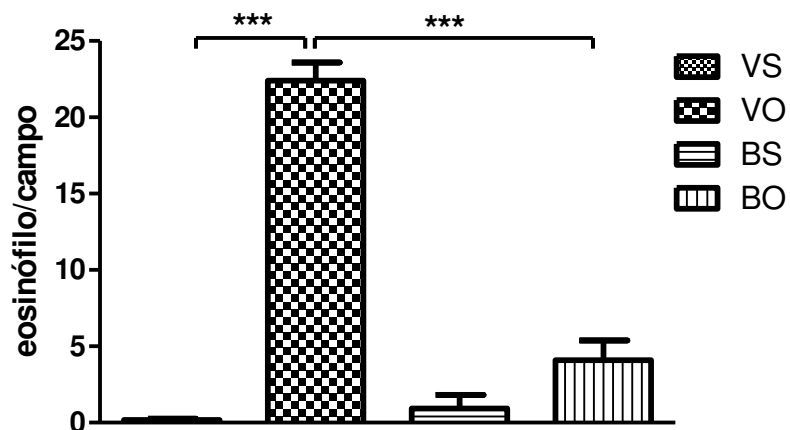


**Figura 5. Efeito do tratamento crônico com BAY 60-2770 sobre o número de leucócitos no sangue circulante.** A contagem de leucócitos totais e/ou eosinófilos no sangue periférico foi realizada 48 horas após desafio a OVA. Grupos: VS (Veículo - instilado com Salina), VO (Veículo - desafiado com OVA), BS (BAY 60-2770 - instilado com Salina) e BO (BAY 60-2770 - desafiado com OVA). Os dados foram expressos como leucócitos totais (A), eosinófilos (B), neutrófilos (C) e mononucleares (D) x 10<sup>5</sup> /mL de sangue circulante, e apresentados como média ± EPM para  $n=5-8$  (\* $p<0,05$ ).

#### 4.3.4. Análise histológica pulmonar

O desafio alérgico à OVA, como esperado, resultou em intenso infiltrado de eosinófilo peri-bronquiolar, observado no grupo VO ( $22.4 \pm 1.2$  EOS/campo) em comparação ao grupo VS ( $0.18 \pm 0.08$  EOS/campo - **Figura 6, A e B**).

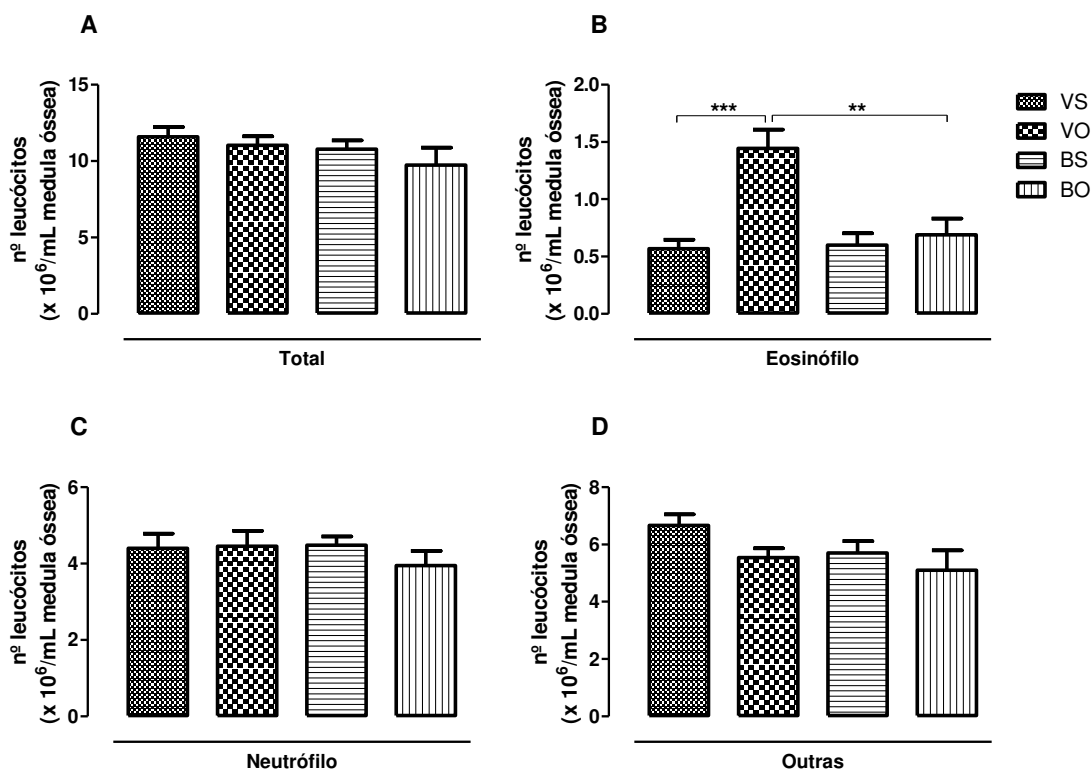
O tratamento crônico com o BAY 60-2270 (grupo BO) inibiu significativamente ( $p < 0.001$ ) o recrutamento de eosinófilos para o parênquima pulmonar em resposta ao desafio com OVA ( $4.10 \pm 1.20$  EOS/campo) comparado com grupo VO. O tratamento com BAY 60-2270, na ausência do desafio (grupo BS), não alterou o perfil de células presentes no parênquima pulmonar quando comparado com o grupo controle VS (**Figura 6, A e B**).

**A****B**

**Figura 6. Análise histológica do parênquima pulmonar.** (A) Fotomicrografia representativa do parênquima pulmonar capturada ao microscópio óptico (aumento de 400x); (B) Quantificação da frequência de eosinófilos presentes na região peri-bronquiolar ( $40 \mu\text{m}^2$ ) expressa como n° de eosinófilo/campo de contagem (média de 5 campos aleatórios), apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n=3$  (\*\*\*)  $p<0,001$ . Grupos: VS (Veículo - instilado com Salina), VO (Veículo - desafiado com OVA), BS (BAY 60-2770 - instilado com Salina) e BO (BAY 60-2770 - desafiado com OVA).

#### 4.3.5. Número de leucócitos em perfusato de medula óssea

O desafio alérgico à OVA não alterou o número total de leucócitos (**Figura 7A**) em perfusato de medula óssea, mas induziu aumento seletivo de eosinófilos 48 horas após o desafio, como observado no grupo VO ( $p<0,001$ ; **Figura 7B**) comparado com grupo VS. A eosinofiloipoiese gerada pelo desafio alérgico à OVA foi inibida pelo tratamento com BAY 60-2770, observada no grupo BO ( $p<0,01$ ) comparado com o grupo VO, sem afetar a resposta no grupo VS. Não houve diferença significativa entre os grupos veículos e tratados com o BAY 60-2770, desafiados ou não a OVA, sobre os perfis de neutrófilos (**Figura 7C**) e outras células (**Figura 7D**) no perfusato de medula óssea.

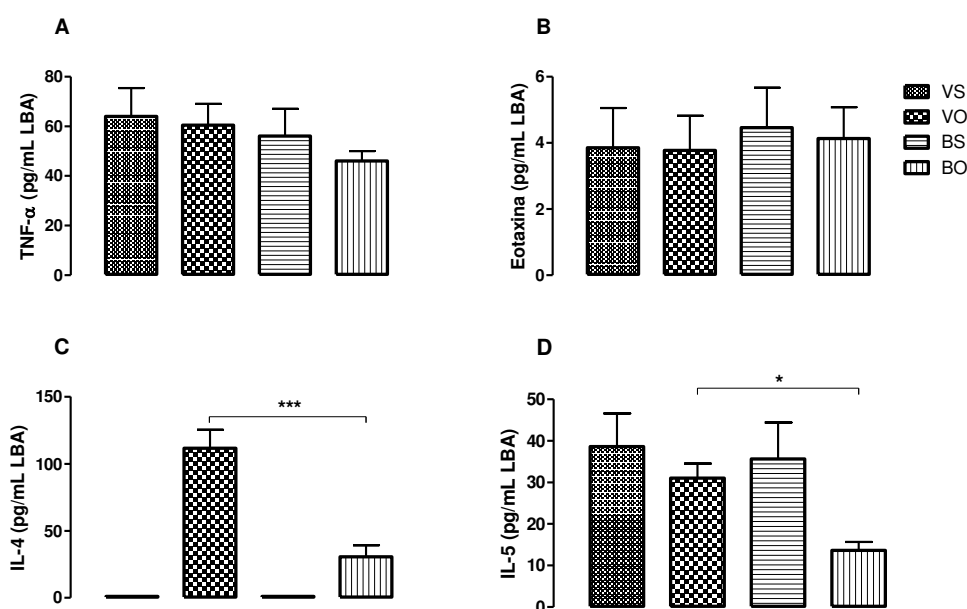


**Figura 7. Efeito do tratamento crônico com BAY 60-2770 no número de leucócitos em perfusato de medula óssea.** A contagem total e diferencial de leucócitos (eosinófilos, neutrófilos e outras) em perfusato de medula óssea foi realizada 48 horas após desafio a OVA, em animais tratados com veículo e/ou BAY 60-2770. Os dados foram expressos como nº de leucócitos x 10<sup>6</sup>/mL de perfusato de medula óssea, e apresentados como média ± EPM para  $n=7-8$  (\*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Grupos: VS (Veículo - instilado com Salina), VO (Veículo - desafiado com OVA), BS (BAY 60-2770 - instilado com Salina) e BO (BAY 60-2770 - desafiado com OVA).

#### 4.3.6. Dosagens de citocinas e eotaxina no LBA

Os níveis de IL-4 (mas não de TNF- $\alpha$ , eotaxina e IL-5) mostraram-se significativamente elevados no LBA após desafio alérgico (**Figura 8**).

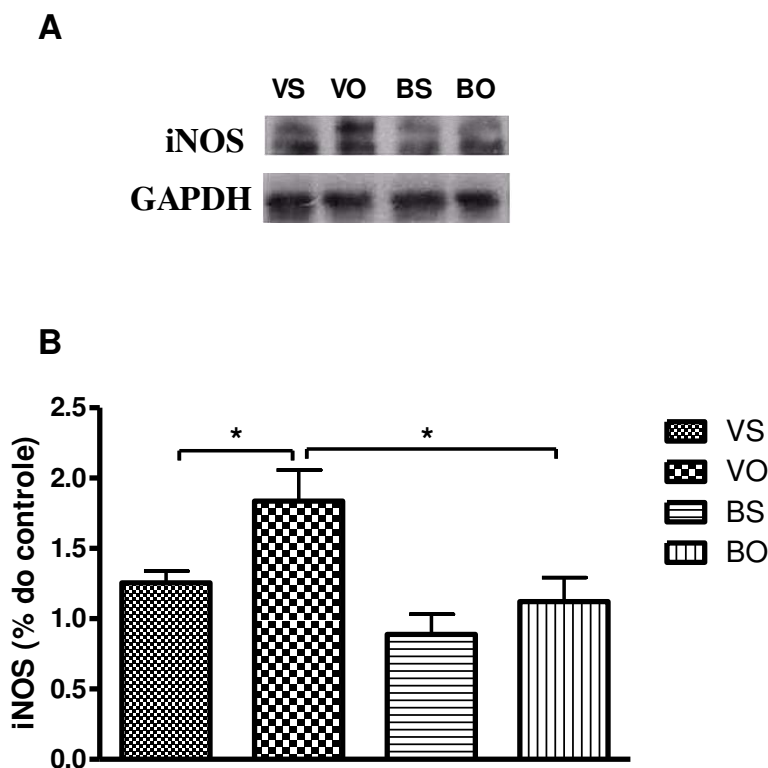
O tratamento crônico com o BAY 60-2770 não modificou significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  (**A**) e eotaxina (**B**), mas reduziu os níveis ( $p<0,001$ ) de IL-4 (**C**) no grupo BO. Os níveis de IL-5 no LBA também foram significativamente ( $p<0,05$ ) diminuídos pelo tratamento com BAY 60-2770 (grupo BO, **Figura 8D**). Níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 não foram detectados nas amostras.



**Figura 8. Efeito do tratamento crônico com BAY 60-2770 sobre os níveis de TNF- $\alpha$  (A), eotaxina (B), IL-4 (C) e IL-5 (D) no LBA.** Os níveis de citocinas foram quantificados no LBA 48 horas após o desafio a OVA, nos animais tratados com veículo e/ou BAY 60-2770. Os dados foram expressos em pg/mL de LBA, e apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n=5-6$  (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Grupos: VS (Veículo - instilado com Salina), VO (Veículo - desafiado com OVA), BS (BAY 60-2770 - instilado com Salina) e BO (BAY 60-2770 - desafiado com OVA).

#### 4.3.7. Expressão proteica da iNOS pulmonar

O desafio alérgico à OVA elevou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) os níveis protéicos da iNOS pulmonar (**Figura 9**) no grupo VO comparado com o grupo controle VS, na ausência de desafio. O tratamento com o BAY 60-2770 reestabeleceu os níveis basais protéicos pulmonares da iNOS observado no grupo BO, comparado com o grupo VO. A expressão protéica pulmonar da iNOS mostrou-se semelhante entre os grupos controles não-tratados (VS) e tratados com BAY 60-2770 (BS), ambos instilados com salina.

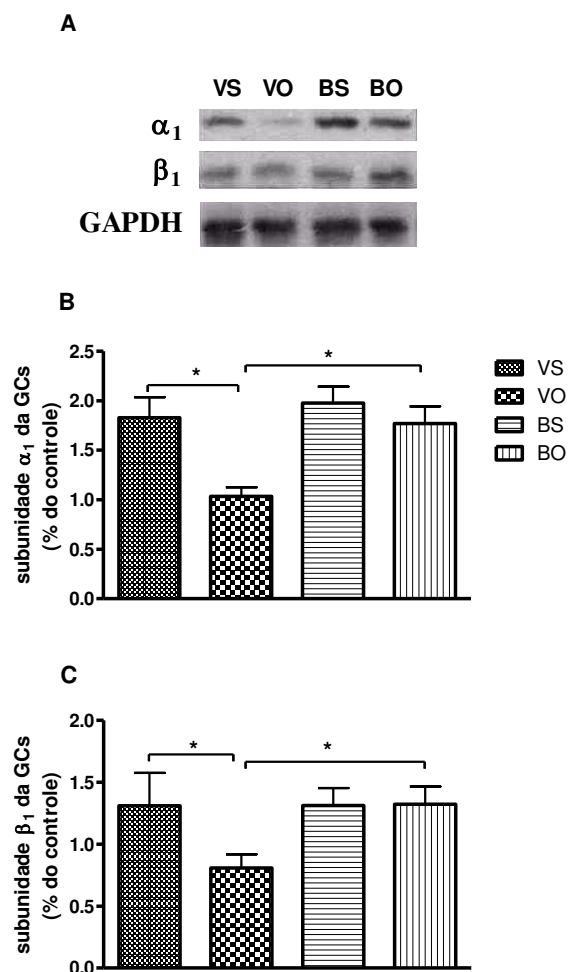


**Figura 9. Expressão protéica(A) da iNOS (B) no tecido pulmonar por Western blotting.** A expressão protéica foi realizada em homogenato de pulmão 48 horas após desafio a OVA, nos grupos tratados com veículo e/ou BAY 60-2770 e instilados com salina e/ou desafiados com OVA. VS (veículo-salina), VO (veículo-OVA), BS (BAY 60-2770-OVA) e BO (BAY 60-2770-OVA). O níveis protéicos foram representados como relação de % sobre a expressão da proteína controle (GAPDH) e apresentados como média de % de unidades arbitrárias (UA)  $\pm$  EPM para  $n=8-11$  ( $*p < 0,05$ ). Grupos: VS (Veículo - instilado com Salina), VO (Veículo - desafiado com OVA), BS (BAY 60-2770 - instilado com Salina) e BO (BAY 60-2770 - desafiado com OVA).

#### **4.3.8. Expressão protéica da GCs (subunidades $\alpha_1/\beta_1$ ) pulmonar**

O desafio alérgico à OVA reduziu significativamente ( $p<0,05$ ) a expressão protéica das subunidades da GCs  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  pulmonares (**Figura 10, A, B e C**) no grupo VO quando comparado com o grupo controle VS.

O tratamento crônico com BAY 60-2770 reestabeleceu os níveis basais protéicos pulmonares das subunidades  $\alpha_1$  ( $p<0,05$ ) e  $\beta_1$  ( $p<0,05$ ) (**Figura 10, A, B e C**) no grupo BO comparado com o grupo VO. A expressão protéica pulmonar das proteínas analisadas foi semelhante entre os grupos controles instilados com salina, tratados com veículo (VS) e/ou com BAY 60-2770 (BS).



**Figura 10. Expressão protéica (A) das subunidades  $\alpha_1$  (B) e  $\beta_1$  (C) da GCs no tecido pulmonar por Western blotting.** A expressão protéica foi realizada em homogenato de pulmão 48 horas após desafio a OVA, nos grupos tratados com veículo e/ou BAY 60-2770 e instilados com salina e/ou desafiados com OVA. Grupos: VS (veículo - instilado com Salina), VO (veículo - desafiado com OVA), BS (BAY 60-2770 - instilado com Salina) e BO (BAY 60-2770 - desafiado com OVA). O níveis protéicos foram representados como relação de % sobre a expressão da proteína controle (GAPDH) e apresentados como média de % de unidades arbitrárias (UA)  $\pm$  EPM para  $n=8-11$ (\* $p<0,05$ ).

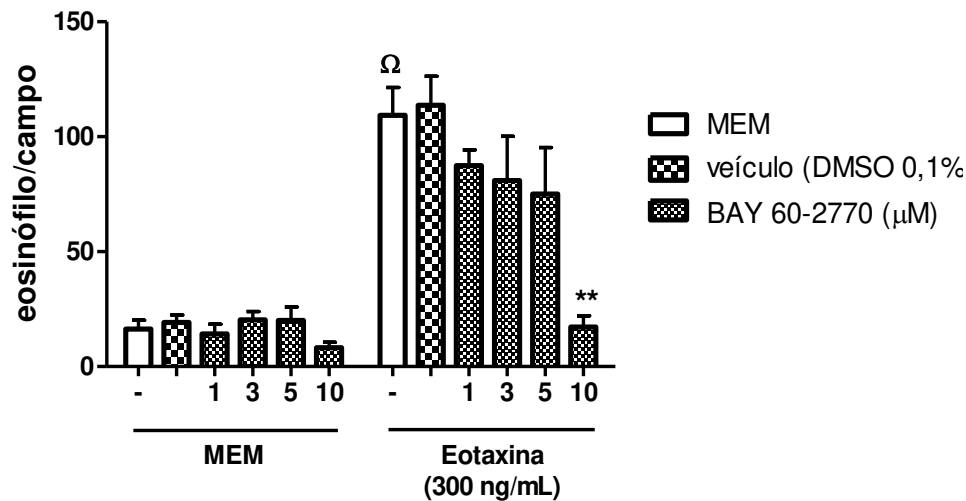


#### 4.4. Quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos isolados de humanos

##### 4.4.1. Efeitos do BAY 60-2770 sobre a quimiotaxia de eosinófilos em resposta à eotaxina

Com o objetivo de avaliar o efeito da ativação da GCs sobre a resposta migratória de eosinófilos, realizamos ensaios de quimiotaxia *in vitro* em resposta ao agente quimiotático, eotaxina, na presença do BAY 60-2770.

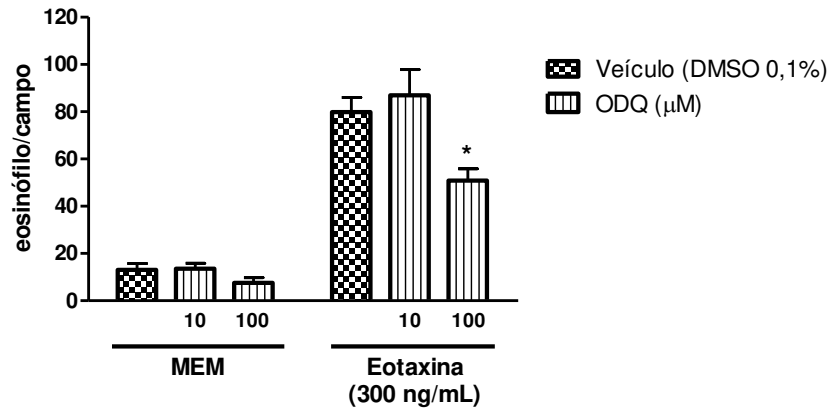
Eosinófilos purificados foram pré-incubados com concentrações crescentes do BAY 60-2770 (1, 3, 5 e 10  $\mu$ M) por 30 minutos (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ambiente úmido), e, em seguida, deixados a migrar por 1 hora em resposta à eotaxina (300 ng/mL MEM) (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ambiente úmido). A **Figura 11** mostra que a migração espontânea de eosinófilos, em resposta ao MEM, não foi significativamente afetada pelo BAY 60-2770 nas concentrações testadas. Como esperado, os eosinófilos migraram significativamente ao gradiente de concentração em resposta à eotaxina quando comparado a migração espontânea ao MEM ( $p < 0,01$ ). A migração de eosinófilos em direção ao gradiente de eotaxina foi abolida na presença do BAY 60-2770 (10  $\mu$ M; painel A;  $p < 0,01$ ), comparado ao controle (veículo, DMSO 0,1%). Nas concentrações de 1 a 5  $\mu$ M, o BAY 60-2770 não interferiu significativamente na resposta quimiotática à eotaxina.



**Figura 11. Efeitos do BAY 60-2770 sobre a quimiotaxia de eosinófilo em resposta à eotaxina.** Os eosinófilos ( $4 \times 10^6$  céls/mL) foram submetidos a incubação prévia de 30 minutos com concentrações crescentes de BAY 60-2770 (1-10  $\mu$ M), antes de migrarem por 1 hora em resposta ao gradiente de concentração de eotaxina (300 ng/mL). A migração de eosinófilos foi expressa como nº de eosinófilos que migraram por campo de contagem. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n=3-5$  indivíduos.  $\Omega p < 0,001$  comparado com MEM;  $**p < 0,01$  comparado com veículo (DMSO 0,1 %).

#### 4.4.2. Efeitos da oxidação da GCs pelo ODQ na migração de eosinófilos em resposta à eotaxina

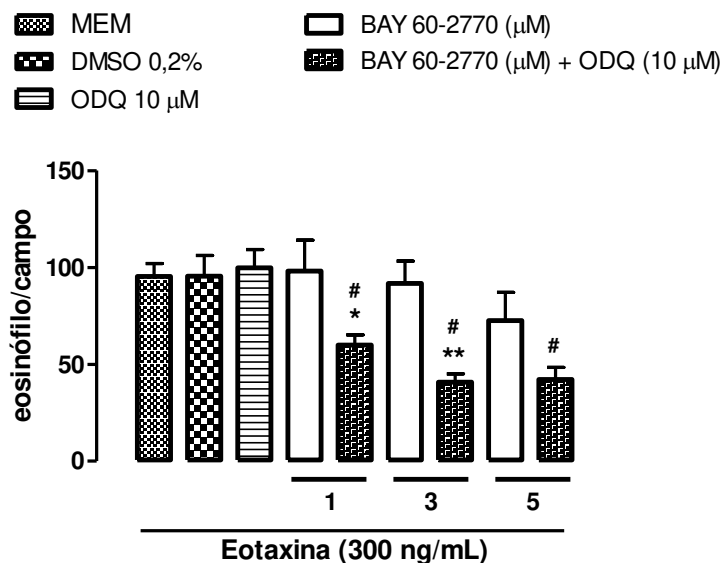
Com o objetivo de avaliar o efeito da oxidação da GCs sobre a resposta migratória de eosinófilos à eotaxina, os eosinófilos foram previamente incubados com ODQ (10 e/ou 100  $\mu$ M), à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ambiente úmido, por 40 minutos, e em seguida, deixados a migrar por 1 hora em direção a eotaxina (300 ng/mL). A **Figura 12** mostra que o ODQ individualmente, na concentração de 10  $\mu$ M, foi incapaz de alterar a quimiotaxia de eosinófilos humanos à eotaxina, ao passo que, na concentração de 100  $\mu$ M, a quimiotaxia foi significativamente inibida quando comparada ao veículo (DMSO 0,1%).



**Figura 12. Efeito da oxidação da GCs pelo ODQ na resposta migratória de eosinófilos à eotaxina *in vitro*.** Os eosinófilos ( $4 \times 10^6$  céls/mL) foram submetidos a pré-incubação com ODQ nas concentrações de 10 e 100  $\mu$ M individualmente por 40 minutos, antes de migrarem por 1 hora em resposta ao gradiente de concentração de eotaxina (300 ng/mL). A migração de eosinófilos em resposta a eotaxina foi expressa como n° de eosinófilos que migraram por campo de contagem. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n=4-6$  indivíduos (\*  $p<0,05$  comparado com Veículo).

#### 4.4.3. Efeito do BAY 60-2770 na migração de eosinófilos em resposta à eotaxina após oxidação da GCs

Este ensaio teve como objetivo avaliar o efeito inibitório do BAY 60-2770 na presença da GCs oxidada sobre a migração de eosinófilos em resposta à eotaxina. Para isso, os eosinófilos foram previamente tratados com ODQ (10  $\mu$ M) por 10 minutos e em seguida incubados com concentrações crescentes de BAY 60-2770 (1-5  $\mu$ M) por 30 minutos, antes de submetê-los a migração em resposta à eotaxina. A **Figura 13** mostra que a migração de eosinófilo em resposta à eotaxina foi significativamente reduzida pelo BAY 60-2770 nas concentrações 1 e 3  $\mu$ M após a oxidação da GCs com ODQ ( $p<0,05$ ). O perfil de resposta inibitória do BAY 60-2770, potencializado após oxidação do grupamento heme da GCs pelo ODQ, sugere um efeito protetor da GCs após a ativação do eosinófilo pela eotaxina.



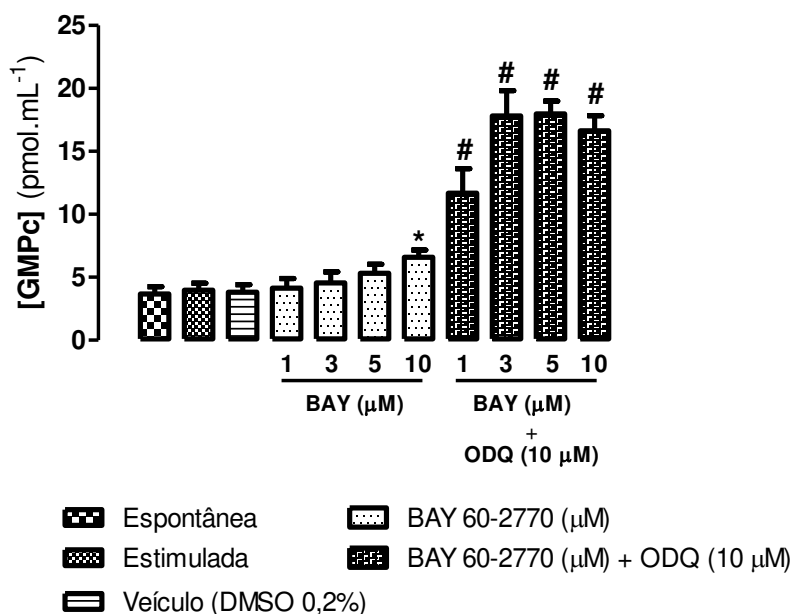
**Figura 13. Oxidação da GCs e o efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a migração de eosinófilo em resposta à eotaxina.** Eosinófilos ( $4 \times 10^6$  céls/mL) previamente tratados com ODQ (10  $\mu$ M) por 10 minutos foram incubados com BAY 60-2770 (1-5  $\mu$ M) durante 30 minutos e em seguida submetidos a quimiotaxia *in vitro* em resposta à eotaxina (300 ng/mL) por 1 hora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ambiente úmido). A migração de eosinófilos foi expressa como n° de eosinófilos que migraram por campo de contagem. Dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n=4-6$  experimentos (# $p < 0,05$  comparado com ODQ 10  $\mu$ M; \* $p < 0,05$  comparado com BAY 60-2770, 1  $\mu$ M; \*\* $p < 0,01$  comparado com BAY 60-2770, 3  $\mu$ M).

#### 4.4.4. Dosagem de GMP cíclico

Os níveis de GMPc intracelulares foram determinados para confirmar o efeito esperado da ativação da GCs pelo BAY 60-2770. Avaliamos a capacidade do BAY 60-2770 em produzir GMPc após oxidação da GCs pelo ODQ, condição que mimetizaria a oxidação da GCs pelo estresse oxidativo gerado na asma.

Como esperado, na **Figura 14** mostramos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis intracelulares de GMPc quando os eosinófilos foram incubados com o BAY 60-2770 (10  $\mu$ M) comparado com o controle (veículo, DMSO 0,2%). O efeito do BAY 60-2770 (1-10  $\mu$ M) foi potencializado ( $p < 0,01$ ) na presença do ODQ (10  $\mu$ M). Não foi observado

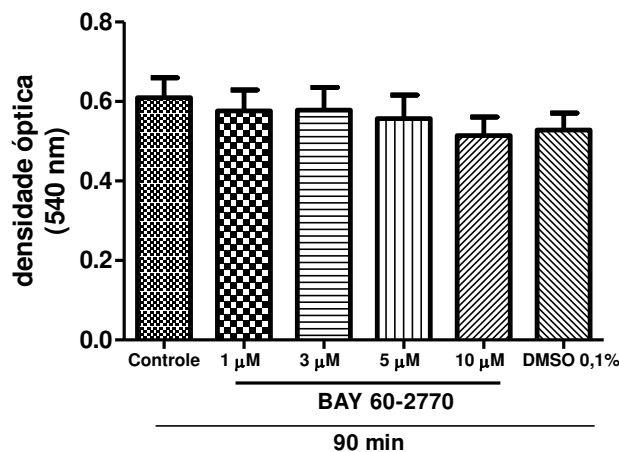
diferença entre os níveis de GMPc entre eosinófilos não-estimulados e estimulados com eotaxina.



**Figura 14. Quantificação de GMPc em eosinófilos humanos.** A suspensão de eosinófilos ( $1 \times 10^6$  céls/mL) tratada com IBMX (2 mM) foi previamente incubada ou não com ODQ (10  $\mu$ M) por 10 minutos; e em seguida, com BAY 60-2770 (1-10  $\mu$ M) por 30 minutos, e posteriormente adicionadas de eotaxina (300 ng/mL) por 1 hora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ambiente úmido). Desta respectiva suspensão celular, foi extraído o GMPc, e quantificado utilizando kit comercial. Dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n=3$  experimentos (\* $p<0,05$  comparado com veículo DMSO 0,2%; # $p<0,01$  comparado com BAY 60-2770 na ausência de ODQ).

#### 4.4.5. Efeitos do BAY 60-2770 sobre a viabilidade do eosinófilo

Realizamos o ensaio de redução do MTT afim de verificar se o tratamento com o BAY 60-2770 afetaria a viabilidade celular. De acordo com a **Figura 15**, os eosinófilos permaneceram viáveis após tratamento com BAY 60-2770, nas mesmas condições (90 min = 30 min pré-incubação + 60 min de migração à eotaxina; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ambiente úmido) e concentrações testadas (1-10  $\mu$ M) nos ensaios de quimiotaxia, excluindo a possibilidade de a migração celular reduzida ser devido a morte celular.



**Figura 15. Efeitos do BAY 60-2770 sobre a viabilidade de eosinófilos.** Os eosinófilos ( $4 \times 10^6$  céls/mL) previamente tratados com BAY 60-2770 (1, 3, 5 e 10  $\mu$ M) por 90 minutos (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ambiente úmido) foram incubados por 3 horas com MTT (5 mg/mL em PBS). A viabilidade celular foi expressa como porcentagem de MTT reduzido em formazam (densidade óptica a 540 nm), na presença e na ausência (controle) do BAY 60-2770. Os dados foram apresentados como média da densidade óptica  $\pm$  EPM para  $n=4$  experimentos.

A GCs é a enzima chave que regula as principais ações fisiológicas do NO em mamíferos mediadas pelo GMPc, produto da sua ativação e conversão a partir do nucleotídeo GTP (Murad, 2006; Derbyshire e Marletta, 2012). A participação do NO na patogênese da asma alérgica tem sido intensamente investigada devido à elevada síntese deste mediador em indivíduos asmáticos e em modelos animais de asma alérgica (Sugiura e Ichinose, 2011). Sabe-se que a maioria das ações do NO são direcionadas à amplificação do processo inflamatório, pois o NO reage ao ambiente oxidativo asmático gerando ERNs, que promovem nitração de proteínas, afetando funções de moléculas biológicas relevantes na inflamação (Ghosh e Erzurum, 2011). Embora o papel do NO na asma seja intensamente explorado, ainda não está claro se suas ações são dependentes de GMPc.

As evidências apontam que as ações do NO consideradas "benéficas" são mediadas quase que exclusivamente pela ativação da GCs (e.g. vasodilatação, broncodilatação, inibição da proliferação da musculatura lisa, do recrutamento de leucócito e agregação plaquetária), ao passo que os efeitos "prejudiciais" são, em sua maioria, independentes de GMPc (Stasch e Hobbs, 2009).

A participação do NO e seus efeitos sobre a locomoção e recrutamento de leucócitos para o sítio inflamado tem sido extensamente investigados. As abordagens farmacológicas, em sua maioria, são realizadas com inibidores seletivos ou não das isoformas de NOS. Porém, poucos estudos abordam o efeito dependente de GMPc em processos inflamatórios. Numerosos estudos em animais utilizando inibidores seletivos de iNOS mostram efeitos antiinflamatórios em modelos de asma. Contudo, o estudo de Fase II em indivíduos com asma moderada mostrou que o composto GW274150, inibidor seletivo para iNOS, foi desprovido de eficácia clínica na resposta asmática imediata e tardia, apesar da potente inibição dos níveis de NO exalado (Singh e col., 2007). De fato, com a descoberta dos estimuladores e ativadores NO- e heme-independentes da GCs torna-se agora possível abordar com precisão o papel do GMPc no quadro inflamatório alérgico das vias pulmonares (Dupont e col., 2014).

Até o momento, não há na literatura estudo abordando a contribuição individual da via GCs-GMPc na asma alérgica. Assim, os ativadores da GCs, como o BAY 60-2770, surgiram como uma atraente e importante ferramenta farmacológica (Evgenov e col., 2006; Stasch e Hobbs, 2009), pois, permite explorar esta sinalização, sem a presença das ações deletérias (interações químicas) do NO, e identificar a contribuição individual do GMPc sobre os mecanismos que regulam a resposta inflamatória alérgica pulmonar. Neste contexto, nosso estudo teve como objetivo inicial avaliar os efeitos do tratamento crônico com o composto BAY 60-2770, um ativador NO- e heme-independente da GCs, sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar murina induzida por OVA.

A sensibilização dos camundongos C57Bl/6 à OVA gerou uma resposta imunológica Th<sub>2</sub> dependente, pois se observou um aumento significativo da concentração de IgE sérica quando comparados com o grupo controle. A produção de IgE específica à OVA não foi inibida pelo BAY 60-2770. Portanto, assumimos que os efeitos sobre a resposta inflamatória alérgica ocasionados pela ativação da GCs-GMPc não são dependentes da supressão e/ou alteração da resposta imune Th<sub>2</sub>. Estudo utilizando culturas celulares murinas e humanas, mostra que o NO, em baixas concentrações, via GMPc, induz seletivamente a diferenciação de células Th<sub>1</sub>, quantificada pela produção de IFN- $\gamma$ , mas não Th<sub>2</sub>, pela produção de IL-5 (Niedbala e col., 2002). Entretanto, pelas metodologias adotadas em nosso trabalho não conseguimos detectar níveis quantificáveis de IFN- $\gamma$  em nenhuma das amostras analisadas de soro, fluido do LBA e perfusato de medula óssea.

A resposta alérgica, induzida pela provocação antigênica à OVA, foi observada 48 horas após a mesma. O perfil leucocitário do LBA nos animais tratados com veículo e desafiados à OVA mostra de forma marcante a presença de eosinófilos, acompanhado do aumento discreto de neutrófilos e linfócitos. A resposta alérgica desencadeada pela OVA foi inibida pelo BAY 60-2770, que reduziu significativamente o número de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos no LBA. Atribuímos os efeitos observados em nossos estudos ao GMPc, produto da GCs ativada. Porém, por limitações metodológicas, não tivemos sucesso na quantificação de GMPc no tecido pulmonar. Entretanto, nossos resultados corroboram com o estudo de Toward e colaboradores (2004), que observaram redução no recrutamento de eosinófilos em cobaias desafiadas à OVA, e de neutrófilos em resposta ao LPS no LBA



pelo bloqueio da degradação de GMPc pelo sildenafil, inibidor seletivo de PDE5. No mesmo estudo, o aumento dos níveis de GMPc pulmonares inibiu a hiperreatividade brônquica das vias aeríferas induzida pela inalação de histamina após desafio à OVA, atenuando mais uma resposta característica da asma alérgica.

Estudos *in vitro* do grupo mostram que a elevação dos níveis intracelulares de GMPc inibe a quimiotaxia (Thomazzi e col., 2004; 2005) e adesão à matrix extracelular de eosinófilos humanos isolados, por regulação negativa da expressão e função das moléculas de adesão, Mac-1 e VLA-4 respectivamente (Conran e col., 2001). Estes fenômenos poderiam explicar em partes a transmigração deficiente de eosinófilos do leito vascular, via endotélio, para o parênquima pulmonar da mucosa brônquica, observado pelo recrutamento reduzido de eosinófilos presentes no LBA e parênquima pulmonar após desafio alérgico.

Estímulos inflamatórios como endotoxinas (LPS), IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Papapetropoulos e col., 1996; Takata e col., 2001), produção descontrolada de NO (Papapetropoulos e col., 1996) e EROs (Gerassimou e col., 2007) são capazes de regular negativamente a expressão da GCs *in vivo* e *in vitro*. Em nosso estudo, a presença da GCs nas vias aeríferas, avaliada pela expressão das subunidades  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  no parênquima pulmonar, foi significativamente reduzida após o desafio à OVA, fenômeno revertido pelo tratamento com o BAY 60-2770. Como os níveis de TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória, não se mostraram elevados em nosso modelo, especulamos que o estresse oxidativo tenha induzido regulação negativa da GCs. Nossos resultados seguem a linha de estudos em camundongos BALB/c, realizado por Papapetropoulos e colaboradores (2006), que mostraram redução da expressão protéica e molecular (RNAm) da GCs (subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta_1$ ) após desafio à OVA, acompanhado de hiperreatividade brônquica, que foi potencializada com o ODQ, agente heme oxidante da GCs. Além disso, perfil semelhante de redução da GCs foi observada em outros modelos inflamatórios, como lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos (Glynos e col., 2007), assim como em modelo murino e pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) (Glynos e col., 2013). Neste último, a restauração da via GCs-GMPc pelo BAY 58-2667 (ativador NO- e heme-independente) foi capaz de atenuar o fenômeno de hiperreatividade brônquica.

O composto BAY 60-2770 é considerado um potente ativador NO- e heme-independente da GCs (Knorr e col., 2008; Pankey e col., 2011; Mendes-Silvério e col., 2012). A estrutura deste composto pode assumir a posição do grupamento heme e atuar como heme-mimético, através de interações mediada por seu grupamento carboxilato com o grupo YxSxR e interações hidrofóbicas na enzima (Kumar e col., 2013), conferindo a esta molécula uma característica protetora da GCs em microambiente sob estresse oxidativo, como é o caso da asma. Entendemos que os efeitos observados em nosso estudo podem ser devidos ao aumento dos níveis de GMPc sistêmico alcançados durante o tratamento crônico, não descartando um possível papel protetor direto do BAY 60-2770 sobre a GCs. O desafio alérgico à OVA em modelo murino de asma alérgica eleva o nível de estresse oxidativo no pulmão e precede fenótipos centrais da asma, sugerindo papel crítico para o mesmo na indução da reposta inflamatória alérgica pulmonar (Park e col., 2009). É plausível que o excesso de NO derivado do aumento da expressão da iNOS juntamente com o ambiente oxidativo pulmonar, com altos níveis de EROs, provoque a mudança do estado redox do grupamento heme, de reduzido/ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sensível ao NO, para oxidado/férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) da GCs, estado este não sensível à ação do NO. Além disso, o excesso de NO pulmonar *per se* poderia auto-regular a expressão da GCs por mecanismos moleculares, desestabilizando a molécula de RNAm codificadora de suas subunidades, como relatado por Filippov e colaboradores (1997), impedindo a sinalização excessiva desencadeada pelo GMPc, fenômeno que interpretamos como pró-inflamatório. Recentemente, mostrou-se que a própria interação inicial do NO com a GCs induz a desensibilização fisiológica da enzima, regulando a sinalização da via GMPc (Fernhoff e col., 2012). Porém, o composto BAY 60-2770 é capaz de potencializar a produção de GMPc pela GCs em seu estado oxidado e/ou na ausência de seu grupamento heme (Hoffmann e col., 2009, 2011; Kumar e col., 2013), conferindo a esta molécula propriedade protetora e restauradora da via GCs-GMPc.

A propriedade anti-inflamatória ou anti-leucocítica da via de sinalização GCs-GMPc foi inicialmente descrita por Ahluwalia e colaboradores (2004) que mostraram que a estimulação da GCs pelo BAY 41-2272 (estimulador NO-independente e heme-dependente da GCs) em animais *knockout* para eNOS<sup>-/-</sup> reduz o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio, induzidas ou não por IL1- $\beta$ , por inibição da expressão de P-selectina. Estudos em

modelo murino de asma alérgica apontam que o recrutamento de leucócitos, particularmente de eosinófilos, é dependente de P-selectina em plaquetas previamente ativadas, que se ligam via PSGL-1 de eosinófilos circulantes (Pitchford e col., 2005). Com base no estudo de Mendes-Silvério e colaboradores (2012), o BAY 60-2770 modula negativamente a atividade *in vitro* de plaquetas humanas via GMPc. Dessa forma, não se poderia descartar um possível efeito anti-plaquetário contribuindo diretamente para a inibição do recrutamento de eosinófilos em nosso modelo *in vivo* utilizado.

Os mastócitos são células centrais em desordens inflamatórias alérgicas, e em quadros asmáticos alérgicos são responsáveis por disparar a resposta inflamatória após reexposição do indivíduo sensibilizado ao antígeno, que se liga à IgE ancorada ao seu receptor FcεRI (Bradding e col., 1992, 2006; Holgate e col., 2008). Como os níveis séricos de IgE circulantes não foram significativamente afetados, assumimos que os níveis elevados de GMPc induzidos pelo BAY 60-2770 tenha afetado outras células que não linfócitos Th2. Assim, supomos que o gatilho bioquímico da interação OVA-IgE-FcεRI tenha sido bloqueado por aumento de GMPc nos mastócitos pulmonares residentes, impedindo sua ativação e secreção granular, refletindo nos níveis reduzidos de IL-4 e IL-5 detectados no LBA. Neste contexto, estudo realizado por Yip e colaboradores (2010) mostraram que a ativação de células progenitoras de mastócitos humanos, previamente sensibilizados com IgE, quantificada pela liberação de histamina, eicosanóides (Cis-Leucotrienos e PGD<sub>2</sub>), citocinas (TNF-α e IL-8), assim como ativação da ERK1/2, JNK1/2 e NF-κB, foram inibidos via GMPc pelo composto DEA/NO, doador de NO. A inibição foi revertida com o ODQ, reforçando o papel protetor do GMPc sobre a ativação mastocitária neste fenômeno.

Os níveis de IL-4 e IL-5 foram significativamente reduzidos no LBA dos animais tratados com o BAY 60-2770, refletindo uma provável inibição mastocitária. Diversas citocinas são responsáveis pela indução e manutenção da asma alérgica humana e em modelos murinos (Finkelman e col., 2010). A IL-4 é produzida por células Th2, mastócitos e eosinófilos ativados, e são necessárias à diferenciação e expansão da linhagem de células Th2, além de suprimirem a diferenciação da linhagem Th1 (Kaiko e col., 2008). É responsável também por induzir o isotipo de células B a produzirem IgE (Finkelman e col., 1988), o crescimento e desenvolvimento de mastócitos (Madden e col., 1991), e o

recrutamento de eosinófilos (Schleimer e col., 1992). Assim, os níveis reduzidos de IL-4 como resultado do tratamento com BAY 60-2770 poderia inibir a manutenção do quadro inflamatório alérgico, suprimindo o recrutamento de células inflamatórias, como os linfócitos, neutrófilos e principalmente os eosinófilos.

Como já descrito anteriormente, a IL-5 derivada de células Th2 e mastócitos, em respostas à IL-4 e IL-13 (Blanchard e col., 2005), atua em sinergismo com a eotaxina, produzida principalmente pelas células epiteliais brônquicas (Gutierrez-Ramos e col., 1999), promovendo o recrutamento seletivo de eosinófilos para o pulmão desafiado ao alérgeno (Simson e Foster, 2000; Pope e col., 2001). Dentre as citocinas envolvidas na asma alérgica, a IL-5 é considerada específica para a linhagem eosinofílica, sendo responsável por "primar" o eosinófilo, induzindo o crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência desses leucócitos (Sanderson, 1992; Collins e col., 1995; Rothenberg e Hogan, 2006; Barnes, 2008). Os níveis de IL-5 foram significativamente reduzidos pelo BAY 60-2770, contribuindo possivelmente para a inibição do recrutamento de eosinófilos observados no LBA e no parênquima pulmonar.

Em nosso modelo observamos eosinofilia no perfusato de medula óssea e sangue periférico, características importantes da asma. De acordo, o número de progenitores eosinofílicos CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>IL-5R $\alpha$  estão aumentados no sangue periférico de asmáticos atópicos sob desafio alérgico (Sehmi e col., 1996, 1997), e também em modelos murinos de inflamação alérgica pulmonar (Johansson e col., 2004; Squebola-Cola e col., 2013). Como o tratamento com o BAY 60-2770 aboliu ambos os fenômenos, é plausível supor inibição da comunicação inflamatória entre a mucosa brônquica, mastócitos, eosinófilos e a medula óssea, por intermédio da produção deficiente das citocinas IL-4 e IL-5, reduzidas no LBA. Sabe-se que, sob desafio alérgico, a mucosa brônquica transmite sinais à medula óssea, para aumentar o "pool" de eosinófilos maduros disponíveis para mobilização e recrutamento, onde a citocina IL-5 em sinergismo com a eotaxina desempenham papel central neste fenômeno (Trivedi e Lloyd, 2007).

A apoptose de células inflamatórias é um evento crítico na resolução da inflamação. Reguladores negativos da diferenciação de eosinófilos são importantes para restaurar a homeostasia em quadros de asma alérgica (Gauvreau e col., 2009; Wegmann, 2011;

Ilmarinen e Kankaanranta, 2014). Embora tenhamos observado uma redução expressiva do número de células inflamatórias, não acreditamos que o BAY 60-2770 tenha desempenhado papel de indutor de apoptose ou morte celular. Estudos revelam que o NO possui propriedades pró- e anti-apoptótica, dependendo da natureza do doador de NO e sua concentração (Taylor e col., 2001, 2003). Ainda controverso, as evidências apontam que o papel anti-apoptótico é dependente de GMPc, fenômeno evidenciado com baixas concentrações de NO (Beauvais e col., 1995; Taylor e col., 2003).

Adotamos no estudo a dose posológica de 1 mg/Kg/14 dias, informações fornecidas pela Bayer (Wuppertal, Alemanha), detentora da descoberta. No primeiro estudo com o ativador, Knorr e colaboradores (2008) observaram um efeito anti-fibrótico do BAY 60-2770, mediado pela sua atividade vasodilatadora. Na dose de 1 mg/Kg, a mesma utilizada em nosso estudo, relataram queda de 10% na pressão arterial, que foi restaurada após 9 horas em ratas espontaneamente hipertensas (SHR). O ativador não provocou alteração hemodinâmica em nosso modelo murino, provavelmente devido a diferença inter-espécie e/ou pelo momento da aferição da pressão sanguínea sistólica, realizada 20 horas após a administração da ante-penúltima dose (16 horas antes do desafio alérgico à OVA).

O papel do GMPc sobre a atividade de eosinófilos ainda permanece controverso. Em um segundo momento deste estudo, avaliamos os efeitos da ativação da GCs pelo BAY 60-2770 sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos em resposta ao agente quimiotático eotaxina. Este estudo demonstra pela primeira vez um efeito inibitório do GMPc frente ao estímulo migratório de eosinófilos à eotaxina.

Inicialmente, a viabilidade celular na presença do BAY 60-2770 foi avaliada pela capacidade dos eosinófilos em reduzir o composto MTT em formazan, produto cromogênico. Apenas células vivas, viáveis, são capazes de reduzir o MTT em formazan por desidrogenases mitocondriais, sendo a produção de formazan diretamente proporcional a viabilidade celular. Assim, comprovamos que o tempo de incubação adotado em no estudo não afetou a viabilidade celular dos eosinófilos na presença do BAY 60-2770 em nossas condições experimentais.

A expressão da GCs em eosinófilos humanos ainda não foi demonstrada na literatura e sua função permanece controversa. Entretanto, estudos mostram que o aumento de GMPc pode inibir a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos de indivíduos saudáveis frente ao agente quimiotático fMLP (Thomazzi e col., 2004) e reduzir a adesão à matrix extracelular, acompanhada de redução da expressão e função das moléculas de adesão, particularmente de Mac-1 e VLA-4 (Conran e col., 2001), fenômenos observados com doadores de NO. A inibição da quimiotaxia também já foi relatada na presença do estimulador da GCs, BAY 41-2272, fenômeno dependente de GMPc, que foi revertido pelo agente oxidante ODQ (Thomazzi e col., 2005).

A eotaxina (CCL11) é considerada a mais potente quimiocina secretada pelo epitélio brônquico e células Th2 diferenciadas frente ao estímulo alérgico, capaz de ativar e induzir o recrutamento seletivo de eosinófilos para o sítio inflamado (Griffiths-Johnson e col., 1993; Jose e col., 1994; Trivedi e Lloyd, 2007). Com base na especificidade e potência de atuação da desta quimiocina, decidimos investigar se a migração *in vitro* de eosinófilos humanos induzida pela eotaxina seria afetada pelo BAY 60-2770.

Estudos mostram que eosinófilos humanos "primados" (previamente incubados) com eotaxina e ou RANTES, ambas quimiocinas ligantes dos receptores CCR3 seletivamente expressos em eosinófilos, potencializam a produção de ROS pela própria eotaxina e/ou com ionóforo de cálcio A23187, elevando o metabolismo oxidativo intracelular (Chihara e col., 1998; Honda e Chihara, 1999; Sannohe e col., 2003). Assim, supomos que o estado de oxidação da GCs poderia ser afetado sob estímulo por eotaxina, como um mecanismo regulador pró-inflamatório. De acordo, Lintomen e colaboradores (2008) não observaram efeitos do NO sobre a ativação de eosinófilos humanos com eotaxina e/ou RANTES, avaliados pela adesão *in vitro* a fibronectina, expressão das integrinas Mac-1 e VLA-4, e desgranulação.

Este estudo mostra que o BAY 60-2770 inibe a migração *in vitro* de eosinófilos humanos frente à eotaxina, por mecanismo dependente de GMPc. A prévia incubação de eosinófilos com ODQ (10µM) potencializou a produção de GMPc intracelular pelo BAY 60-2770 nas concentrações menores (1, 3 e 5 µM), inibindo significativamente a migração celular frente à eotaxina quando comparado com as mesmas concentrações de BAY 60-

2770 individualmente. Nossos resultados apontam a GCs oxidada como potencializadora dos efeitos observados pelo BAY 60-2770, que vai ao encontro de estudos anteriores (Pankey e col., 2011; Mendes-Silvério e col., 2012; Lasker e col., 2013; Alexandre e col., 2014; Leiria e col., 2014). Como discutido anteriormente, o BAY 60-2770 apresenta propriedades protetora e heme-mimética da GCs (Kumar e col., 2013). Em condições de alto stress oxidativo celular, como é o caso da asma (Sugiura e Ichinose, 2008), seria plausível a ocorrência da modificação do estado redox da GCs de reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ), ou até mesmo o favorecimento do processo de degradação da GCs em eosinófilos, fenômeno que poderia ser revertido pelo BAY 60-2770, atuando de forma protetora e restauradora da via GCs-GMPc.

A capacidade de eosinófilos humanos hidrolizar GMPc é questionável. Até o momento, apenas a fosfodiesterase 4 (PDE) e subtipos A, B e D foram predominantemente detectadas em eosinófilos e neutrófilos humanos, mas a PDE3 ainda é discutida (Pryzwansky e Madden, 2003). Embora a PDE4 apresente alta afinidade de ligação ao AMPc ( $k_m \sim 1\text{--}10\text{ mM}$ ), possui baixa afinidade ao GMPc ( $k_m > 50\text{ mM}$ ) (Francis e col., 2010). Assim, não descartamos possível elevação indireta dos níveis de AMPc induzida por aumento de GMPc intracelular em resposta ao BAY 60-2770, mecanismo de *crosstalk* entre nucleotídeos cíclicos (Maurice, 2005; Surapisitchat e col., 2007). Níveis elevados de AMPc inibem a quimiotaxia de eosinófilos humanos (Kaneko e col., 1995; Giembycz e Lindsay, 1999). O papel do AMPc na inflamação pulmonar é bem estabelecido na literatura, onde inibidores seletivos de PDE4 surgiram como ferramenta terapêutica na asma, pois inibem as duas principais características desta doença, que é o recrutamento de eosinófilos e a hiperreatividade brônquica (Spina e col., 2003; Page e Spina, 2012; Beghè e col., 2013).

Este estudo revela que o BAY 60-2770 é capaz de promover efeito antiinflamatório *in vivo* em murinos alérgicos desafiados à OVA, inibindo o recrutamento de leucócitos, particularmente eosinófilos, para as vias aeríferas inflamadas, efeito este acompanhado pela redução dos níveis de IL-4 e IL-5 no LBA, e restauração dos níveis de GCs e iNOS pulmonar. A quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos frente à eotaxina foi inibida pelo BAY 60-2770 de modo dependente de GMPc, efeito potencializado pela oxidação prévia

da GCs. Juntos, estes resultados apontam o BAY 60-2770 como uma droga antiinflamatória e a GCs como importante alvo terapêutico na asma.



## 6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

---

Segundo nossos resultados, concluímos que:

- I. A inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA, caracterizada pela migração de eosinófilos para o tecido pulmonar, eosinofiloiose, e eosinofilia sanguínea foi significativamente reduzida pelo tratamento com o BAY 60-2770, sem alteração dos níveis séricos circulantes de IgE;
- II. A inflamação alérgica pulmonar foi acompanhada de aumento da expressão protéica de iNOS, e redução das subunidades  $\beta_1$  e  $\alpha_1$  da GCs no parênquima pulmonar, fenômenos que foram restaurados pelo tratamento com BAY 60-2770;
- III. Níveis significativamente reduzidos das citocinas IL-4 e IL-5 no LBA acompanharam os efeitos inibitórios do BAY 60-2770;
- IV. A quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos humanos induzida por eotaxina (CCL11) foi inibida pelo BAY 60-2770 de modo dependente de GMPc;
- V. O efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a resposta quimiotática foi potencializado na presença do agente oxidante ODQ;
- VI. O ensaio de MTT mostrou que o BAY 60-2770 não afeta a viabilidade celular, nos tempos de incubação adotados no estudo.

Em nossas condições experimentais, concluímos que o ativador NO- e heme-independente da GCs, BAY 60-2770, possui potente propriedade antiinflamatória, pois inibe o quadro de inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA, e a quimiotaxia de eosinófilos humanos *in vitro* induzida por eotaxina, por mecanismos dependentes de GMPc. Este estudo também aponta a GCs como um importante alvo terapêutico no tratamento da resposta inflamatória alérgica das vias aeríferas, e abre caminho para novas linhas de investigação na asma.



## REFERÊNCIAS

---

ABRAHAM WM, Delehunt JC, Yerger L, Marchette B. Characterization of a late phase pulmonary response after antigen challenge in allergic sheep. *Am Rev Respir Dis.* **1983**;128:839-44.

ALEXANDRE EC, Leiria LO, Silva FH, Mendes-Silvério CB, Calmasini FB, Davel AP, Mónica FZ, De Nucci G, Antunes E. Soluble guanylyl cyclase (sGC) degradation and impairment of nitric oxide-mediated responses in urethra from obese mice: reversal by the sGC activator BAY 60-2770. *J Pharmacol Exp Ther.* **2014**; 349:2-9.

AHLUWALIA A, Foster P, Scotland RS, McLean PG, Mathur A, Perretti M, Moncada S, Hobbs AJ. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2004**; 101:1386-91.

AKINBAMI LJ, Moorman JE, Garbe PL, Sondik EJ. Status of childhood asthma in the United States, 1980-2007. *Pediatrics.* **2009**; 123(suppl 3):S131-S145.

BANDEIRA-MELO C, Herbst A, Weller PF. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2001**; 24:653-7.

BARACAT JS, Teixeira CE, Okuyama CE, Priviero FB, Faro R, Antunes E, De Nucci G. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol.* **2003**; 477:163-9.

BARNES PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev.* **1999**; 50:515–575.

BARNES, PJ. Glucocorticoids and asthma. *Ernst Schering Res Found Workshop.* **2002**; 40:1-23.

BARNES PJ. Role of GATA-3 in allergic diseases. *Curr Mol Med.* **2008**; 8:330-4.

BATH PMW, Hassall DG, Gladwin A-M, Palmer RMJ, Martin JF. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arter Thromb*. **1991**; 11:254–60.

BÁU FR, Mónica FZ, Priviero FB, Baldissera L Jr, de Nucci G, Antunes E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. **2010**; 637:171-7.

BEAVO, JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*. **1995**; 75:725–748.

BEAUVAIS F, Michel L, Dubertret L. The nitric oxide donors, azide, and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. *FEBS Lett*. **1995**; 361: 229–232.

BEGHÈ B, Rabe KF, Fabbri LM. Phosphodiesterase-4 inhibitor therapy for lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. **2013**; 188(3):271-8.

BEIGELMAN A, Weinstock GM, Bacharier LB. The relationships between environmental bacterial exposure, airway bacterial colonization, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. **2014**; 14:137-42.

BLANCHARD C, Durual S, Estienne M, Emami S, Vasseur S, Cuber JC. Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is upregulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6. *Int J Biochem Cell Biol*. **2005**; 37:2559-73.

BOCHNER BS. Cellular adhesion and its antagonism. *J Allergy Clin Immunol*. **1997**; 100:581-5.

BRADDING P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bews JP, Hunt TC, Okayama Y, Heusser CH, e col. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med*. **1992**; 176(5):1381-6.

BRADDING P, Okayama Y, Howarth, PH, Church MK, Holgate, ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol*. **1995**; 155:297–307.

BRADDING P, Walls AF, Holgate, ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **2006**; 117:1277–84.

BREWER JP, Kisselgof AB, Martin TR. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* **1999**; 160(4):1150-6.

BROIDE DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* **2008**; 121:560-570.

BROIDE D, SRIRAMARAO P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol Rev.* **2001**; 179:163-72.

BUSSE WW, Lemanske RF Jr, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet.* **2010**; 376:826-34.

CHIHARA J, Yamada H, Yamamoto T, et al. Priming effect of RANTES on eosinophil oxidative metabolism. *Allergy.* **1998**; 53: 1178–1182.

CHU SC, Marks-Konczalik J, Wu HP, Banks TC, Moss J. Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem Biophys Res Commun.* **1998**; 248:871-8.

COCKCROFT DW, DAVIS BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* **2006**;118:551-559.

COLLINS PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med.* **1995**; 182:1169-74.

COMHAIR SA, Bhathena PR, Dweik RA, Kavuru M, Erzurum SC. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet.* **2000**; 355:624.

CONRAN N, Ferreira HHA, Lorand-Metze I, Thomazzi SM, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. *Br J Pharmacol*. **2001**; 134:632–638.

CONROY DM, WILLIAMS TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res*. **2001**; 2(3):150-6.

COOPER PJ, Chico ME, Vaca MG, Rodriguez A, Alcântara-Neves NM, Genser B. e col. Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). *BMC Pulm Med*. **2006**; 6:24.

DAUGHERTY BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotina A, Springer MS. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med*. **1996**; 183(5):2349-54.

DEMPSEY OJ, Kerr KM, Gomersall L, Remmen H, Currie GP. Idiopathic pulmonary fibrosis: an update. *QJM*. **2006**; 99:643–654.

DENG YM, Xie QM, Tang HF, Sun JG, Deng JF, Chen JQ, Yang SY. Effects of ciclamilast, a new PDE4 PDE4 inhibitor, on airway hyperresponsiveness, PDE4D expression and airway inflammation in a murine model of asthma. *Eur J Pharmacol*. **2006**; 547:125-35.

DENT G, Giembycz MA, Evans PM, Rabe KF and Barnes PJ. Suppression of human eosinophil respiratory burst and cyclic AMP hydrolysis by inhibitors of type IV phosphodiesterase: Interaction with the beta adrenoceptor agonist albuterol. *J Pharmacol Exp Ther*. **1994**; 271:1167–1174.

DENT G, Giembycz MA, Rabe KF and Barnes PJ. Inhibition of eosinophil cyclic nucleotide PDE activity and opsonised zymosan-stimulated respiratory burst by “type IV”-selective PDE inhibitors. *Br J Pharmacol*. **1991**; 103:1339–1346.

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

DONNELLY LE, BARNES PJ. Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26 **2002**; 26:144–151.

DUNKERN TR, Feurstein D, Rossi GA, Sabatini F, Hatzelmann A. Inhibition of TGF-beta induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. *Eur J Pharmacol.* **2007**; 572:12–22.

DUPONT LL, Glynos C, Bracke KR, Brouckaert P, Brusselle GG. Role of the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. *Pulm Pharmacol Ther.* **2014**; 29:1-6.

DWEIK RA, Comhair SA, Gaston B, Thunnissen FB, Farver C, Thomassen MJ, Kavuru M, Hammel J, Abu-Soud HM, Erzurum SC. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2001**; 98:2622-7.

DWEIK RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko F, Hutte R, Stuehr DJ, Erzurum SC. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest.* **1998**; 101:660-6.

EDER W, Ege MJ, Von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med.* **2006**; 355:2226-2235.

ELIAS JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest.* **1999**;104:1001-6.

EVGENOV OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* **2006**; 5:755-68.

FERNHOFF NB, Derbyshire, E. R., and Marletta, M. A. A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2009**; 106:21602-21607.

FERNHOFF NB, Derbyshire ER, Underbakke ES, Marletta MA. Heme-assisted S-nitrosation desensitizes ferric soluble guanylate cyclase to nitric oxide. *J Biol Chem.* **2012**; 287:43053-62.

FERREIRA HH, Medeiros MV, Lima CS, Flores CA, Sannomiya P, Antunes E, De Nucci G. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur J Pharmacol.* **1996**; 310:201-7.

FERREIRA HH, Bevilacqua E, Gaglioti SM, De Luca IM, Zanardo RC, Teixeira CE, Sannomiya P, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur J Pharmacol.* **1998**; 358:253-9.

FILIPPOV G, Bloch DB, and Bloch KD. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest.* **1997**; 100: 942–948.

FINKELMAN F, Katona I, Urban JJ, Holmes J, Ohara J, Tung A e col. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol.* **1988**; 141: 2335–2341.

FINKELMAN FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol.* **2010**; 184:1663-74.

FOERSTER J, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G, Koesling, D. A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  subunits. *Eur J Biochem.* **1996**; 240, 380–386.

FRANCIS SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* **2010**; 62:525-63.

FREITAS CF, Morganti RP, Annichino-Bizzacchi JM, De Nucci G, Antunes E. Effect of BAY 41-2272 in the pulmonary hypertension induced by heparin-protamine complex in anaesthetized dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **2007**;34:10-4.



GALLI SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. **2008**; 454:445-54.

GAUVREAU GM, Ellis AK, Denburg JA. Haemopoietic processes in allergic disease: eosinophil/basophil development. *Clin Exp Allergy*. **2009**; 39:1297-306.

GERASSIMOU C, Kotanidou A, Zhou Z, Simoes DC, Roussos C, Papapetropoulos A. Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. *Br J Pharmacol*. **2007**; 8:1084-91.

GIEMBYCZ MA, LINDSAY MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev*. **1999**; 51:213-340.

GLYNOS C, Kotanidou A, Orfanos SE, Zhou Z, Simoes DC, Magkou C, Roussos C, Papapetropoulos A. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in LPS-induced lung injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **2007**; 292:1448-55.

GLYNOS C, Dupont LL, Vassilakopoulos T, Papapetropoulos A, Brouckaert P, Giannis A, Joos GF, Bracke KR, Brusselle GG. The role of soluble guanylyl cyclase in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. **2013**; 188:789-99.

GHOSH S, ERZURUM SC. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. **2011**; 1810:1008-1016.

GONLUGUR U, EFEOGLU T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes. *Cell Tissue Res*. **2004**; 318(3):473-82.

GONZALO JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez AC, Siegelman MH, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest*. **1996**; 98:2332-2345.

GONZALO JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A, Martinez AC, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med*. **1998**; 188:157-167.

GRIFFITHS-JOHNSON DA, Collins PD, Rossi AG, Jose PJ, Williams TJ. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* **1993**; 197:1167– 1172.

GUO FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, Calhoun W, Erzurum SC. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol.* **2000**; 164:5970-80.

GUO FH, Uetani K, Haque SJ, Williams BR, Dweik RA, Thunnissen FB, Calhoun W, Erzurum SC. Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *J Clin Invest.* **1997**; 100:829-38.

GUO FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1995**; 92:7809-13.

GUTIERREZ-RAMOS JC, Lloyd C, Gonzalo JA. Eotaxin: from an eosinophilic chemokine to a major regulator of allergic reactions. *Immunol Today.* **1999**; 20:500-504.

HAMAD AM, Sutcliffe AM, Knox AJ. Aspirin-induced asthma: clinical aspects, pathogenesis and management. *Drugs.* **2004**; 64:2417-32.

HANSEL TT, De Vries IJ, Iff T, Rihs S, Wandzilak M, Betz S, Blaser K, Walker C. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods.* **1991**; 145:105-10.

HALLSTRAND TS. New insights into pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* **2012**; 12:42-8.

HAMMAD H, LAMBRECHT BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* **2006**; 118:331–6.

HARGREAVE FE, NAIR P. The definition and diagnosis of asthma. *Clin Exp Allergy*. **2009**; 39:1652-8.

HENDERSON WR Jr, Chiang GK, Tien YT, Chi EY. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med*. **2006**; 173:718-28.

HOBBS A. Soluble guanylate cyclase. *Emerg Therap Targets*. **2000**; 735–749.

HOFFMANN LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol*. **2009**; 157:781-95.

HOFFMANN LS, Schmidt PM, Keim Y, Hoffmann C, Schmidt HH, Stasch JP. Fluorescence dequenching makes haem-free soluble guanylate cyclase detectable in living cells. *PLoS One*. **2011**; 6:e23596.

HOFMANN F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*. **2006**; 86:1–23.

HOGAN SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. **2008**; 38:709-50.

HOLGATE, ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. **2008**; 38(6):872-97.

HOLGATE ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*. **2012**; 18(5):673-83.

HONDA K, CHIHARA J. Eosinophil activation by eotaxin-eotaxin primes the production of reactive oxygen species from eosinophils. *Allergy*. **1999**; 54: 1262–1269.

IGNARRO LJ, Adams JB, Horwitz PM, Wood KS. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J Biol Chem*. **1986**; 261:4997–5002.

IGNARRO LJ, Wood KS, Wolin MS. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1982**; 79:2870–2873.

ILMARINEN P, KANKAANRANTA H. Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. **2014**; 114:109-17.

IYER LM, Anantharaman V, Aravind L. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics*. **2003**; 4:5.

JOHANSSON AK, Sjostrand M, Tomaki M, Samulesson AM, Lotvall J. Allergen stimulates bone marrow CD34(+) cells to release IL-5 in vitro: a mechanism involved in eosinophilic inflammation? *Allergy*. **2004**; 59, 1080 – 1086.

JONES AW, Durante W, Korthuis RJ. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. *J Pharmacol Exp Ther*. **2010**; 335:85-91.

JOSE PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh, DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*. **1994**; 179:881-887.

KAIKO G, Horvat J, Beagley K, Hansbro P. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*. **2008**; 123: 326–338.

KANEHIRO A, Ikemura T, Mäkelä MJ, Lahn M, Joetham A, Dakhama A, Gelfand EW. Inhibition of phosphodiesterase 4 attenuates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a model of secondary allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. **2001**; 163:173-84.

KANEKO T, Alvarez R, Ueki IF, Nadel JA. Elevated intracellular cyclic AMP inhibits chemotaxis in human eosinophils. *Cell Signal*. **1995**; 7(5):527-34.

KANNAN MS, JOHNSON DE. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. *Life Sci*. **1995**; 56:2229–2238.

KAPLAN SS, Billiar T, Curran RD, Zdziarski UE, Simmons RL, Basford RE. Inhibition of chemotaxis with N G-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood*. **1989**; 74:1885–1887.

KHATRI SB, Ozkan M, McCarthy K, Laskowski D, Hammel J, Dweik RA, Erzurum SC. Alterations in exhaled gas profile during allergen-induced asthmatic response. *Am J Respir Crit Care Med.* **2001**; 164:1844-8.

KHARITONOV SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet.* **1994**; 133-135.

KNORR A, Hirth-Dietrich C, Alonso-Alija C, Härter M, Hahn M, Keim Y, Wunder F, Stasch JP. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. *Arzneimittelforschung.* **2008**; 58:71-80.

KOBZIK L, Imrich A, Massaro A and Drazen JM. Eosinophil expression of nitric oxide synthase-3 and nitrotyrosine antigens (Abstract). *Am J Respir Crit Care Med.* **1997**; 155:A60.

KOJDA G, HARRISON D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* **1999**; 43:562-71.

KROEGEL C, Virchow JC, Walker C. Asthma. *New Engl J Med.* **1993**; 328:1639-1640.

KUMAR RK, Foster PS, Rosenberg HF. Respiratory viral infection, epithelial cytokines, and innate lymphoid cells in asthma exacerbations. *J Leukoc Biol.* **2014**; 96:391-396.

KUMAR RK, Herbert C, Thomas PS, Wollin L, Beume R, Yang M, Webb DC, Foster PS. Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003**; 307(1):349-55.

KUMAR V, Martin F, Hahn MG, Schaefer M, Stamler JS, Stasch JP, van den Akker F. Insights into BAY 60-2770 activation and S-nitrosylation-dependent desensitization of soluble guanylyl cyclase via crystal structures of homologous nostoc H-NOX domain complexes. *Biochemistry.* **2013**; 52:3601-8.

LAMPINEN M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* **2004**; 59(8):793-805.

LASKER GF, Pankey EA, Frink TJ, Zeitzer JR, Walter KA, Kadowitz PJ. The sGC activator BAY 60-2770 has potent erectile activity in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2013**; 304:H1670-9.

LEIRIA LO, Silva FH, Davel AP, Alexandre EC, Calixto MC, De Nucci G, Mónica FZ, Antunes E. The soluble guanylyl cyclase activator BAY 60-2770 ameliorates overactive bladder in obese mice. *J Urol*. **2014**; 191:539-47.

LI L, Xia Y, Nguyen A, Lai YH, Feng L, Mosmann TR, Lo D. Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol*. **1999**; 162, 2477-2487.

LILLY CM. Diversity of asthma: Evolving concepts of pathophysiology and lessons from genetics. *J Allergy Clin Immunol*. **2005**;115:S526-531.

LINTOMEN L, Elsas MI, Maximiano ES, de Paula Neto HA, Joseph D, Vargaftig BB, Elsas PX. Allergenic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclo-oxygenase inhibitors in mice. *Br J Pharmacol*. **2002**; 135(5):1315-23.

LINTOMEN L, Franchi G, Nowill A, Condino-Neto A, de Nucci G, ZanESCO A, Antunes E. Human eosinophil adhesion and degranulation stimulated with eotaxin and RANTES in vitro: lack of interaction with nitric oxide. *BMC Pulm Med*. **2008**; 8:13.

LI Z, Xi X, Gu M, Feil R, Ye RD, Eigenthaler M, Hofmann F, Du X. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell*. **2003**; 112; 77-86.

LUCAS KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*. **2000**; 52: 375–414.

MACKENZIE JR, Mattes J, Dent LA, Foster PS. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol*. **2001**; 167(6):3146-55.

MARON BA, Zhang YY, Handy DE, Beuve A, Tang SS, Loscalzo J, and Leopold JA. Aldosterone increases oxidant stress to impair guanylyl cyclase activity by cysteinyl thiol oxidation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **2009**; 284:7665–7672.

MA Y, HayGlass KT, Becker AB, Fan Y, Yang X, Basu S, Srinivasan G, Simons FE, Halayko AJ, Peng Z. Novel recombinant interleukin-13 peptide-based vaccine reduces airway allergic inflammatory responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* **2007**; 176:439-45.

MA Y, Hayglass KT, Becker AB, Halayko AJ, Basu S, Simons FE, Peng Z. Novel cytokine peptide-based vaccines: an interleukin-4 vaccine suppresses airway allergic responses in mice. *Allergy.* **2007**; 62:675-82.

MADDEN K, Urban JJ, Ziltener H, Schrader J, Finkelman F, Katona I. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J Immunol.* **1991**; 147: 1387–1391.

MASSARO AF, Mehta S, Lilly CM, Kobzik L, Reilly JJ, Drazen JM. Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* **1996**; 153:1510-4.

MARKS-KONCZALIK J, Chu SC, Moss J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J Biol Chem.* **1998**; 273:22201-8.

MARTINEZ FD, VERCELLI D. Asthma. *Lancet.* **2013**; 382:1360-72.

MAURICE DH. Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system. *Front Biosci.* **2005**; 10:1221–1228.

MAURICE DH and HASLAM RJ. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol Pharmacol.* **1990**; 37:671–681.

MAYER B, Brunner F, Schmidt K. Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J.* **1993**; 14:22–26.

MAYER B, KOESLING D. cGMP signalling beyond nitric oxide. *Trends Pharmacol Sci.* **2001**; 22:546–548.

McFADDEN ER. Asthma. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL Harrison's Principles of Internal Medicine. 13th. Ed., New York, McGraw-Hill; **1994**. p. 1167-1172.

MENDES-SILVERIO CB, Leiria LO, Morganti RP, Anhê GF, Marcondes S, Mónica FZ, De Nucci G, Antunes E. Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway. *PLoS One.* **2012**; 7:e47223.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, Estatísticas de Mortalidade, 2000.

MINSHALL EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, Hamid Q. Eosinophil associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1997**; 17:326–333.

MONCADA S, HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* **1993**; 329:2002-12.

MÓNICA FZ, Reges R, Cohen D, Silva FH, De Nucci G, D'Ancona CA, Antunes E. Long-term administration of BAY 41-2272 prevents bladder dysfunction in nitric oxide-deficient rats. *Neurourol Urodyn.* **2011**; 30:456-60.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **1983**; 65:55-63.

MURAD F. Shattuck lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med.* **2006**; 355:2003-2011.

NATHAN C, XIE QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* **1994**; 78:915-8.



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

NIOCHE P, Berka V, Vipond J, Minton N, Tsai AL, Raman CS. Femtomolar sensitivity of a NO sensor from *Clostridium botulinum*. *Science*. **2004**; 306:1550-3.

NONAKA M, Nonaka R, Woolley K, Adelroth E, Miura K, Okhawara Y, Glibetic M, Nakano K, O'Byrne P, Dolovich J, Manel J. Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J Immunol*. **1995**; 155:3234-3244.

O'BYRNE PM, Gauvreau GM, Wood LJ. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. **1999**; 29:27-32, supplement 2.

OH SW, Pae CI, Lee DK, Jones F, Chiang GK, Kim HO, Moon SH, Cao B, Ogbu C, Jeong KW, Kozu G, Nakanishi H, Kahn M, Chi EY, Henderson WR Jr. Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol*. **2002**; 168:1992-2000.

OLESEN SP, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Busse R, Mülsch A. Characterization of NS2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol*. **1998**; 123:299-309.

PAGE CP, SPINA D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. *Curr Opin Pharmacol*. **2012**; 12(3):275-86.

PANKEY EA, Bhartiya M, Badejo AM Jr, Haider U, Stasch JP, Murthy SN, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator, BAY 60-2770, are not dependent on endogenous nitric oxide or reduced heme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2011**; 300:H792-802.

PAPAPETROPOULOS A, Cziraki A, Rubin JW, Stone CD, and Catravas JD. cGMP accumulation and gene expression of soluble guanylate cyclase in human vascular tissue. *J Cell Physiol*. **1996**; 167:213-221.

PAPAPETROPOULOS A, Abou-Mohamed G, Marczin N, Murad F, Caldwell RW, and Catravas JD. Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta. *Br J Pharmacol.* **1996**; 118:1359-1366.

PAPAPETROPOULOS A, Go CY, Murad F, and Catravas JD. Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* **1996**; 117:147-155.

PAPAPETROPOULOS A, Simoes DC, Xanthou G, Roussos C, Gratziou C. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2006**; 290(1):179-84.

PAPOUTSAKIS C, Priftis KN, Drakouli M, Prifti S, Konstantaki E, Chondronikola M, Antonogeorgos G, Matziou V. Childhood overweight/obesity and asthma: is there a link? A systematic review of recent epidemiologic evidence. *J Acad Nutr Diet.* **2013**; 113:77-105

PARK CS, Kim TB, Lee KY, Moon KA, Bae YJ, Jang MK, Cho YS, Moon HB. Increased oxidative stress in the airway and development of allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **2009**; 103:238-47.

PEARCE N, DOUWES J. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? *J Pediatr.* **2006**; 82:319-321.

PEASE JE, WILLIAMS TJ. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol.* **2001**; 1:248-53.

PELLICENA P, Karow DS, Boon EM, Marletta MA, Kuriyan J. Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2004**; 101:12854–12859.

PERSSON MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet.* **1994**; 343:146-7.

PITCHFORD SC, Momi S, Giannini S, Casali L, Spina D, Page CP, Gresele P. Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation. *Blood.* **2005**; 105(5): 2074-2081.

PONATH PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest.* **1996**; 97:604 – 612.

POPE SM, Brandt EB, Mishra A, Hogan SP, Zimmermann N, Matthaei KI, et al. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol.* **2001**; 108:594-601.

PRADO CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2006**; 35:457-65.

PRYOR WA, SQUADRITO GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* **1995**; 268:L699–L722.

PRYZWANSKY KB, MADDEN VJ. Type 4A cAMP-specific phosphodiesterase is stored in granules of human neutrophils and eosinophils. *Cell Tissue Res.* **2003**; 312: 301–311.

PUNNONEN J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1993**; 90:3730-4.

QUARCOO D, Weixler S, Joachim RA, Stock P, Kallinich T, Ahrens B, Hamelmann E. Resiquimod, a new immune response modifier from the family of imidazoquinolinamines, inhibits allergen-induced Th2 responses, airway inflammation and airway hyper-reactivity in mice. *Clin Exp Allergy.* **2004**; 34:1314-20.

REDMAN TK, Rudolph K, Barr EB, Bowen LE, Muggenburg BA, Bice DE. Pulmonary immunity to ragweed in a Beagle dog model of allergic asthma. *Exp Lung Res.* **2001**; 27:433-51.

RICHARDS KL, MCCULLOUGH J. A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. *Immunol Commun.* **1984**; 13:49-62.

- RICCIARDOLO FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* **2004**; 84:731-65.
- RICCIARDOLO FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G. The guinea pig as an animal model for asthma. *Curr Drug Targets.* **2008**; 9(6):452-65.
- RIESE RJ, CHAPMAN HA. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* **2000**; 12:107–13.
- ROSENBERG HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **2007**; 119:1303-10.
- ROTHENBERG ME, HOGAN SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* **2006**; 24:147-74.
- SALEH D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J.* **1998**; 12:929-37.
- SANDERS SP. Nitric oxide in asthma. Pathogenic, therapeutic, or diagnostic? *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1999**; 21(2):147-9.
- SANDERSON CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood.* **1992**; 79,3101- 3109.
- SANNOHE S, Adachi T, Hamada K, Honda K, Yamada Y, Saito N, Cui CH, Kayaba H, Ishikawa K, Chihara J. Upregulated response to chemokines in oxidative metabolism of eosinophils in asthma and allergic rhinitis. *Eur Respir J.* **2003**; 21:925-31.
- SATO E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity in vitro. *Am J Pathol.* **1999**; 155(2):591-8.
- SAYED N, Baskaran, P., Ma, X., van den Akker, F., and Beuve, A. Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2007**; 104, 12312–12317.

SCHLEIMER R, Sterbinsky S, Kaiser J, Bickel C, Klunk D, Tomioka K et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol.* **1992**; 148:1086-1092.

SCHINDLER U, Strobel H, Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, Rutten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Topfer A, Pistorius A, Jannek C, Mulsch A. Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* **2006**; 69:1260–1268.

SCHMIDT HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol.* **2009**; 191:309-39.

SCHMIDT PM, Schramm M, Schroder H, Wunder F, Stasch JP. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem.* **2004**; 279:3025–3032.

SCHRAMMEL A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* **1996**; 50:1–5.

SEHMI R, Dorman S, Baatjes A, Watson R, Foley R, Ying S, Robinson DS, Kay AB, O'Byrne PM, Denburg JA. Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology.* **2003**; 109:536-546.

SEHMI R, Howie K, Sutherland DR, Schragge W, O'Byrne PM, Denburg JA. Increased levels of CD34+ hemopoietic progenitor cells in atopic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1996**; 15:645-655.

SEHMI R, Wood LJ, Watson R, Foley R, Hamid Q, O'Byrne PM, Denburg JA. Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-subunit expression on bone marrow-derived CD34+ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation. *J Clin Invest.* **1997**; 100:2466-2475.

SIMSON L, FOSTER PS. Chemokine and cytokine cooperativity: eosinophil migration in the asthmatic response. *Immunol Cell Biol.* **2000**; 78:415-22.

SMIT JJ, LUKACS NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol.* **2006**; 533:277-88.

SNAPPER CM, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* **1987**; 139:10-7.

SINGH D, Richards D, Knowles RG, Schwartz S, Woodcock A, Langley S, O'Connor BJ. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition has no effect on allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* **2007**; 176, 988–993.

SOLÉ D, Filho NA, Sarinho ES, Camelo-Nunes IC, Barreto BA, Medeiros ML, Motta JM, Camargos PA, Mallol J, Gurgel R, de Andrade DM, Furlan FP, Silva AR, Cardozo C, Andrade C. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012). *J Pediatr (Rio J).* **2014**; doi: 10.1016/j.jped.2014.05.002. [Epub ahead of print]

SOLÉ D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK; ISAAC - Grupo Brasileiro. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Phase 3. *J Pediatr (Rio J).* **2006**; 82:341-6.

SPINA D. Phosphodiesterase-4 inhibitors in the treatment of inflammatory lung disease. *Drugs.* **2003**; 63:2575–2594.

SQUEBOLA-COLA DM, Mello GC, Pissinatti L, Schenka AA, Anhê GF, DeSouza IA, Condino-Neto A, Antunes E. Airway exposure to staphylococcal enterotoxin A potentiates allergen-induced bone marrow eosinophilia and trafficking to peripheral blood and airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2013**; 304:L639-45.

STASCH JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H S AK, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper

- B, Müller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest.* **2006**; 116:2552–2561.
- STASCH JP, HOBBS AJ. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol.* **2009**; 191:277-308.
- STUEHR DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta.* **1999**; 1411:217-30.
- SUCHANKOVA J, Voprsalova M, Kottova M, Semecky V, Visnovsky P: Effects of oral alpha-tocopherol on lung response in rat model of allergic asthma. *Respirology.* **2006**; 11:414–421.
- SUGIURA H, ICHINOSE M. Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. *Antioxid Redox Signal.* **2008**; 10:785-97.
- SUGIURA H, ICHINOSE M. Nitrative stress in inflammatory lung diseases. Nitric Oxide. **2011**; 25:138-44.
- SUNAHARA RK, Beuve A, Tesmer JJ, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG.. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem.* **1998**; 273:16332–16338.
- SURAPISITCHAT J, Jeon KI, Yan C, and Beavo JA. Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circ Res.* **2007**; 101:811–818.
- TAKATA M, Filippov G, Liu H, Ichinose F, Janssens S, Bloch DB, Bloch KD. Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2001**; 280:L272-8.
- TAYLOR BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM Jr, Billiar TR, Geller DA. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* **1998**; 273:15148-56.

TAYLOR EL, Megson IL, Haslett C and Rossi AG. Dissociation of DNA fragmentation from other hallmarks of apoptosis in nitric oxide-treated neutrophils: differences between individual nitric oxide donor drugs. *Biochem Biophys Res Commun.* **2001**; 289: 1229–1236.

TAYLOR EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ.* **2003**; 10(4):418-30.

TESMER JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs $\alpha$ -GTP $\gamma$ S. *Science.* **1997**; 278:1907-1916.

The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J.* **1998**; 12:315-35.

THOMAZZI SM, 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.* **2005**; 69:875-82.

THOMAZZI SM, Moreira J, Marcondes S, De Nucci G, Antunes E. Role of cyclic GMP on inhibition by nitric oxide donors of human eosinophil chemotaxis in vitro. *Br J Pharmacol.* **2004**; 141:653-60.

TOWARD TJ, Smith N, Broadley KJ: Effect of Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Sildenafil (Viagra), in Animal Models of Airways Disease. *Am J Resp Crit Care Med.* **2004**; 169:227-234.

TRIVEDI SG, LLOYD CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci.* **2007**; 64:1269-89.

UETANI K, Der SD, Zamanian-Daryoush M, de La Motte C, Lieberman BY, Williams BR, Erzurum SC. Central role of double-stranded RNA-activated protein kinase in microbial induction of nitric oxide synthase. *J Immunol.* **2000**; 165:988-96.

VARGAFTIG BB. What can we learn from murine models of asthma? *Clin Exp Allergy.* **1999**, 29:9-13, supplement 1.



VERNON MK, Wiklund I, Bell JA, Dale P, Chapman KR. What do we know about asthma triggers? a review of the literature. *J Asthma*. **2012**; 49:991-8.

VON GARNIER C, Filgueira L, Wikstrom M. e col. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol*. **2005**; 175:1609-18.

WEDEL B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G, Koesling D. Mutation of His-105 in the  $\beta$ 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1994**; 91:2592–2596.

WEGMANN M, Göggel R, Sel S, Sel S, Erb KJ, Kalkbrenner F, Renz H, Garn H. Effects of a low-molecular-weight CCR-3 antagonist on chronic experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2007**; 36(1):61-7.

WEGMANN, M. Targeting eosinophil biology in asthma therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2011**; 45:667-74.

WHITEHEAD GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2003**; 285(1):L32-42.

WILSON SJ, Shute JK, Holgate ST, Howarth PH, Bradding P. Localization of interleukin (IL)-4 but not IL-5 to human mast cell secretory granules by immunoelectron microscopy. *Clin Exp Allergy*. **2000**; 30:493–500.

WINGER JA, MARLETTA MA. Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: interaction with the heme domain. *Biochemistry*. **2005**; 44:4083–4090.

WOERLY G, Lacy P, Younes AB, Roger N, Loiseau S, Moqbel R, Capron M. Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. *J Leukoc Biol*. **2002**; 72:769-779.

WRIGHT RJ. Stress and atopic disorders. *J Allergy Clin Immunol*. **2005**; 116:1301-6.

XIE QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* **1993**; 177:1779-84.

YAMAMOTO M, Tochino Y, Chibana K, Trudeau JB, Holguin F, Wenzel SE. Nitric oxide and related enzymes in asthma: relation to severity, enzyme function and inflammation. *Clin Exp Allergy.* **2011**; 42:760-8.

YIP KH, Huang Y, Leung FP, Lau HY. Cyclic guanosine monophosphate dependent pathway contributes to human mast cell inhibitory actions of the nitric oxide donor, diethylamine NONOate. *Eur J Pharmacol.* **2010**; 632:86-92.

ZABEL U, Hausler C, Weeger M, Schmidt HHHW. Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem.* **1999**; 274:18149–18152.

ZABEL U, Weeger M, La M, Schmidt HHHW. Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J.* **1998**; 335:51–57.

ZANARDO RC, Costa E, Ferreira HH, Antunes E, Martins AR, Murad F, De Nucci G. Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. *ProcNatAcadSci USA.* **1997**; 94:14111-4.

ZEIBECOGLOU K, Macfarlane AJ, Ying S, Meng Q, Pavord I, Barnes NC, Robinson DS, Kay AB. Increases in eotaxin-positive cells in induced sputum from atopic asthmatic subjects after inhalational allergen challenge. *Allergy.* **1999**; 54:730 – 735.

ZHANG L, PLOW EF. A discrete site modulates activation of I domains. Application to integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem.* **1996**; 271:29953-7.

ZHAO Y, Brandish PE, DiValentin M, Schelvis JP, Babcock GT, and Marletta MA. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODC. *Biochemistry.* **2000**; 39:10848–10854.

ZHENG S, De BP, Choudhary S, Comhair SA, Goggans T, Slee R, Williams BR, Pilewski J, Haque SJ, Erzurum SC. Impaired innate host defense causes susceptibility to respiratory virus infections in cystic fibrosis. *Immunity.* **2003**;18:619-30.

ZOSKY GR, SLY PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. **2007**; 37:973-88.

ZOSKY GR, von Garnier C, Stumbles PA, Holt PG, Sly PD, Turner DJ. The pattern of methacholine responsiveness in mice is dependent on antigen challenge dose. *Respir Res*. **2004**; 5:15.





CEUA/Unicamp

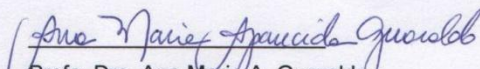
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

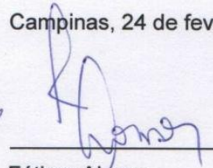
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Estudo dos efeitos do BAY 60-2770 em modelo murino de asma alérgica induzida por ovalbumina" (protocolo nº 2622-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Lineu Baldissera Júnior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 24 de fevereiro de 2012.

Campinas, 24 de fevereiro de 2012.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Efeito do BAY 60-2770, ativador NO- e heme-independente da guanilil ciclase solúvel, na atividade funcional de eosinófilos humanos

**Identificação do paciente:**

Nome : \_\_\_\_\_  
Idade: \_\_\_\_\_  
Sexo: \_\_\_\_\_  
RG: \_\_\_\_\_

O abaixo assinado,

\_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do coordenador deste, Dr. Edson Antunes, do departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. O abaixo assinado está ciente que:

1. O projeto tem como objetivos investigar os efeitos induzidos pelo BAY 60-2770 na migração, ativação e adesão de eosinófilos humanos, bem como os mecanismos de ação envolvidos nestas respostas.
2. A participação neste estudo é voluntária e a recusa não terá qualquer prejuízo.
3. A participação neste estudo não tem nenhum benefício terapêutico ao participante.
4. Será coletado da veia do braço 60 mL de sangue. A coleta será feita por profissional treinado e todo material utilizado será estéril e descartável. Os riscos são mínimos, mas caso haja algum problema, será atendido pelo médico responsável e encaminhado ao serviço de Pronto Socorro da Unidade Hospitalar da Unicamp, se necessário.

5. As informações e os resultados obtidos no decorrer do estudo serão secretos, zelando-se pela privacidade do voluntário. Seu nome, ou do seu protocolo de pesquisa, ou qualquer identificação pessoal, não serão utilizados nesse estudo e, portanto não será incluído em qualquer resultado ou publicação resultante deste.

6. Será garantida a cada participante uma cópia do TCLE.

---

Nome e Assinatura do Participante

---

Nome e Assinatura do Responsável

Maiores esclarecimentos sobre este estudo poderão ser obtidos com:

**Lineu Baldissera Júnior ou Dr. Edson Antunes**

Departamento de Farmacologia

Faculdade de Ciências Médicas

UNICAMP CP6111

13084-971

Campinas (SP)

Fone: (19) 3521-9557

**Caso dúvidas entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP**

Fone: (19) 3521-8936

Fax: (19) 3521-8925