

***EFEITO DO BAY 41-2272, UM ATIVADOR DA GUANILATO  
CICLASE SOLÚVEL POR MECANISMO INDEPENDENTE DE  
ÓXIDO NÍTRICO, EM EOSINÓFILOS HUMANOS***

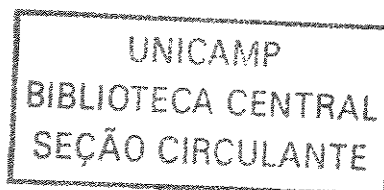
*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Juliana Moreira.*

*Campinas, 31 de agosto de 2004.*

*Prof. Dr. Edson Antunes*  
*- Orientador -*

**CAMPINAS**

**2004**



**JULIANA MOREIRA**

***ESTUDO DO BAY 41-2272, UM ATIVADOR DA GUANILATO  
CICLASE SOLÚVEL POR MECANISMO INDEPENDENTE DE  
ÓXIDO NÍTRICO, EM EOSINÓFILOS HUMANOS***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual  
de Campinas para Obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia, Área de Concentração Farmacologia.*

***ORIENTADOR: EDSON ANTUNES***

***CAMPINAS***

***2004***

UNIDADE	BL
Nº CHAMADA	TTUNICAMP
	M813 e
V	EX
TOMBO, BC/	6J672
PROC.	16-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	12,00
DATA	03-1-05
Nº CPD	

Bibid 338222

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

M85e

Moreira, Juliana

Efeito do BAY 41-2272, um ativador do guanilato ciclase solúvel por mecanismo independente de óxido nítrico, em eosinófilos humanos / Juliana Moreira. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Edson Antunes

Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

I. Eosinófilos. 2. Quimiotaxia. 3. Óxido nítrico. I. Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



---

## **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

### **Orientador:**

**Prof. Dr. Edson Antunes**

---

---

### **Membros:**

**Prof. Dr. Edson Antunes**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Heloisa Helena de Araújo Ferreira**

---

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

---

**Data: 31/08/2004**

---

*À minha filha  
Júlia que me ensinou o valor da vida.*

*Pouca ciência conduz ao ateísmo.  
Muita ciência conduz à Deus.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antônio e Lúcia e meus queridos irmãos pelo apoio e incentivo incessantes.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela oportunidade, pelos ensinamentos e excelente orientação.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pelo fornecimento de materiais imprescindíveis.

À Dra. Sara M. Thomazzi por ter me recebido e orientado desde o meu primeiro dia no laboratório e pela amizade.

À Profa. Dra. Heloisa H. de Araújo Ferreira pela prontidão em nos emprestar materiais quando precisávamos e pela recente amizade.

Aos meus adoráveis amigos Márcia, Rafael e Raquel por terem compartilhado comigo alegrias e tristezas e pelo auxílio constante.

À todos os colegas alunos e professores pela amizade e paciência em responder minhas intermináveis dúvidas de iniciante.

Ao querido Juliano L. Sartoretto pelo amor e exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos doadores de sangue.

À CAPES pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**LISTA DE MATERIAIS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
1.1. Aspectos Gerais do Processo Inflamatório	23
1.2. Eosinófilos	25
1.3. Guanilato Ciclase Solúvel e GMPc	34
1.4. Óxido Nítrico: Síntese e Ações Fisiológicas	36
1.5. Via NO-GMPc e Inflamação Experimental	38
1.5.1. Estudos in vivo	38
1.5.1. Estudos in vitro	39
1.6. Adenilato Ciclase e Inflamação	41
1.7. Novos Compostos ativadores da GCs Independente de NO	42
1.8. Objetivos	45
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>46</b>
2.1. Amostras de Sangue	47
2.2. Obtenção de Eosinófilos	47



□ <i>Isolamento de Eosinófilos</i>	47
□ <i>Separação Imunomagnética de Células</i>	48
□ <i>Seleção Imunomagnética Negativa de Eosinófilos</i>	49
□ <i>Contagem de Células</i>	49
2.3. <i>Ensaio de Quimiotaxia In Vitro</i>	50
2.4. <i>Dosagem de GMPc e AMPc</i>	51
□ <i>Extração do GMPc e AMPc</i>	51
□ <i>Dosagem do GMPc e AMPc</i>	52
2.5. <i>Ensaio de Atividade Celular pelo MTT</i>	53
2.6. <i>Protocolos de Incubação do BAY 41-2272 em eosinófilos</i>	54
□ <i>Protocolos de 10 min de Incubação</i>	54
□ <i>Protocolos de 90 min de Incubação</i>	54
2.7. <i>Análise Estatística</i>	55
<b>3. RESULTADOS</b>	56
3.1. <i>Efeito do BAY 41-2272 sobre a Quimiotaxia de eosinófilos estimulados com fMLP</i>	57
3.2. <i>Efeito do BAY 41-2272 Sobre os Níveis Intracelulares de GMPc</i>	59
3.3. <i>Efeito do ODQ Sobre os Níveis Intracelulares de GMPc Induzidos Pelo BAY 41-2271</i>	60
3.4. <i>Efeito do BAY 41-2272 Sobre os Níveis Intracelulares de AMPc</i>	61
3.5. <i>Ensaio de Atividade Celular Pelo MTT</i>	63

<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>64</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<i>5.1. Sumário e Conclusão</i>	<b>74</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>75</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>94</b>

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>ILUSTRAÇÃO 1</b>	<i>Principais estruturas do eosinófilo humano</i>	25
<b>ILUSTRAÇÃO 2</b>	<i>Moléculas de adesão presentes no eosinófilo e seus respectivos ligantes</i>	30
<b>ILUSTRAÇÃO 3</b>	<i>Mecanismo de deslizamento e adesão do eosinófilo: envolvimento de moléculas de adesão</i>	31
<b>ILUSTRAÇÃO 4</b>	<i>Coluna de separação imunomagnética MACS</i>	48

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	<i>Efeito do BAY 41-2272 sobre a quimiotaxia de eosinófilos estimulados pelo fMLP</i>	58
<b>FIGURA 2</b>	<i>Efeito do BAY 41-2272 sobre os níveis intracelulares de GMPc em eosinófilos após 10 ou 90 min de incubação</i>	59
<b>FIGURA 3</b>	<i>Efeito do ODQ sobre o aumento dos níveis intracelulares de GMPc em eosinófilos incubados por 90 min com BAY 41-2272</i>	60
<b>FIGURA 4</b>	<i>Efeito do Bay 41-2272 sobre os níveis intracelulares de AMPc em eosinófilos após 10 ou 90 min de incubação</i>	62
<b>FIGURA 5</b>	<i>Efeito do BAY 41-2272 sobre a ativação celular, realizada pelo MTT</i>	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AMPc</i>	<i>Adenosina monofosfato cíclico</i>
<i>AMT</i>	<i>2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosina trifosfato</i>
<i>BSA</i>	<i>Albumina de soro bovino</i>
<i>BAY 41-2272</i>	<i>5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridina-3-il]- pirimidina-4-ilamina</i>
<i>CaM</i>	<i>Calmodulina</i>
<i>CD</i>	<i>Cluster of differentiation</i>
<i>CO<sub>2</sub></i>	<i>Carbogênio</i>
<i>Cys-LT<sub>1</sub></i>	<i>Cistenil leucotrieno 1</i>
<i>DEA-NO</i>	<i>dietillamonio(Z)-1-(N,N-dietilamino)diazen-1-ium-1,2-diotate</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetil sulfóxido</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonuclease</i>
<i>ECP</i>	<i>Proteína catiônica do eosinófilo</i>
<i>EDN</i>	<i>Neurotoxina derivada do eosinófilo</i>
<i>EDRF</i>	<i>Fator de relaxamento derivado de endotélio</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etileno-diamino-tetraacético</i>
<i>eNOS</i>	<i>Óxido nítrico sintase endotelial</i>
<i>EPO</i>	<i>Peroxidase do eosinófilo</i>
<i>EPX</i>	<i>Proteína X do eosinófilo</i>
<i>FAD</i>	<i>Flavina adenina dinucleotídeo</i>

<i>fMLP</i>	<i>N-formil-metionil-leucil-fenilalanina</i>
<i>FMN</i>	<i>Flavina mononucleotídeo</i>
<i>GC</i>	<i>Guanilato ciclase</i>
<i>GC<sub>s</sub></i>	<i>Guanilato ciclase solúvel</i>
<i>GEA 3162</i>	<i>5-amino-3-(3,4-diclorofenil)1,2,3,4-oxatriazolium</i>
<i>GEA 5024</i>	<i>1,2,3,4-oxatriazolium,5-amino-3-(3-cloro-2-metil-fenil)-cloridre</i>
<i>GliCAM</i>	<i>Glycosylation-dependent, cell adhesion molecule</i>
<i>GM-CSF</i>	<i>Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos</i>
<i>GMP<sub>c</sub></i>	<i>Guanosina monofosfato cíclico</i>
<i>GTP</i>	<i>Guanosina trifosfato</i>
<i>HANKS</i>	<i>HBSS = Hanks' balanced salts solution</i>
<i>HCl</i>	<i>Ácido clorídrico</i>
<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	<i>Peróxido de hidrogênio</i>
<i>H<sub>4</sub>B</i>	<i>Tetrahidrobiopterina</i>
<i>IBMX</i>	<i>3-isobutil-1-metil-xantina</i>
<i>ICAM-1</i>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
<i>IFN</i>	<i>Interferon</i>
<i>IL</i>	<i>Interleucina</i>
<i>iNOS</i>	<i>Óxido nítrico sintase induzível</i>
<i>KHCO<sub>3</sub></i>	<i>Bicarbonato de potássio</i>
<i>LCF</i>	<i>Fator quimiotático de linfócitos</i>
<i>L-NAME</i>	<i>N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster</i>
<i>L-NMMA</i>	<i>N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina</i>

<i>LPS</i>	<i>Lipopolissacarídeo</i>
<i>LT</i>	<i>Leucotrieno</i>
<i>MACS</i>	<i>Magnetic cell separation</i>
<i>MBP</i>	<i>Proteína básica principal</i>
<i>MCP</i>	<i>Proteína quimiotóxica de monócito</i>
<i>MEM</i>	<i>Meio mínimo essencial de Eagle</i>
<i>MIP</i>	<i>Proteína inflamatória de macrófagos</i>
<i>MTT</i>	<i>Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difetil tetrazólico</i>
<i>NADPH</i>	<i>Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida</i>
<i>NH<sub>4</sub>Cl</i>	<i>Cloreto de amônio</i>
<i>NMA</i>	<i>Ng-monometil-L-arginina</i>
<i>nNOS</i>	<i>Óxido nítrico sintase neuronal</i>
<i>NO</i>	<i>Óxido nítrico</i>
<i>NOS(s)</i>	<i>Óxido nítrico sintase(s)</i>
<i>O<sub>2</sub><sup>-</sup></i>	<i>Ânion superóxido</i>
<i>ODQ</i>	<i>1H-[1, 2, 4] oxadiazolo quinoxalin-1-one</i>
<i>OH<sup>•</sup></i>	<i>Radical hidroxila</i>
<i>ONOO<sup>-</sup></i>	<i>Ânion peroxinitrito</i>
<i>OVA</i>	<i>Ovalbumina</i>
<i>PAF</i>	<i>Fator ativador de plaquetas</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PDEs</i>	<i>Fosfodiesterases</i>
<i>PECAM</i>	<i>Platelet endothelial cells adhesion molecule</i>
<i>PG</i>	<i>Prostaglandina</i>

<i>PGI<sub>2</sub></i>	<i>Prostaciclina</i>
<i>PKA</i>	<i>Proteína quinase dependente de AMPc</i>
<i>PMN(s)</i>	<i>Polimorfonuclear(es)</i>
<i>PSGL-1</i>	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
<i>RANTES</i>	<i>Regulated on activation, normal T-expressed and secreted</i>
<i>RNA<sub>m</sub></i>	<i>Ácido ribonucléico mensageiro</i>
<i>Ro 20-1724</i>	<i>4-(3-ciclopentiloei)-a-metoxifenil)-2-pirrolidinone</i>
<i>SDS</i>	<i>Dodecilsulfato de sódio</i>
<i>SIN-1</i>	<i>3-morfolinosidnonimina</i>
<i>SNAP</i>	<i>S-nitroso-N-acetilpenicilamina</i>
<i>SNP</i>	<i>Nitroprussiato de sódio</i>
<i>TGF</i>	<i>Fator de crescimento e transformação</i>
<i>TNF</i>	<i>Fator de necrose tumoral</i>
<i>TRIM</i>	<i>1-(2-trifluorometilfenil) imidazol</i>
<i>TX</i>	<i>Tromboxano</i>
<i>VCAM-1</i>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
<i>VLA-4</i>	<i>Very late antigen 4 – <math>\alpha_4\beta_1</math> – CD49d/CD29</i>
<i>YC-1</i>	<i>3-(5-hidroximetil-2-furil)-1-benzilindazole</i>
<i>1400W</i>	<i>(N-(3- (aminometil) benzil) acetamidina)</i>
<i>5'-AMP</i>	<i>5'-adenosina monofosfato acíclico</i>



**LISTA DE MATERIAIS**

<i>Azul de Trypan</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>BSA</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>BAY 41-2272</i>	<i>Bayer AG (Wuppertal, Alemanha)</i>
<i>Diff-Quik®</i>	<i>Baxter Healthcare Corp. (DE, EUA)</i>
<i>DMSO</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>EDTA</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>Filtro de polycarbonato</i>	<i>Nuclepore Pleasanton (CA, EUA)</i>
<i>fMLP</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>Giemsa</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>IBMX</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>Iloprost</i>	<i>Schering Chemical (Alemanha)</i>
<i>Kit para dosar GMPc</i>	<i>Cayman Chemical Company (MI, EUA)</i>
<i>Kit para dosar AMPc</i>	<i>Cayman Chemical Company (MI, EUA)</i>
<i>May-Grünwald</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>MEM</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>Microbeads</i>	<i>Miltenyi Biotec Inc. (Bergisch-Gladbach, Alemanha)</i>
<i>MTT</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>ODQ</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>OVA</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>Percoll</i>	<i>Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)</i>
<i>Iloprost</i>	<i>Schering Chemical (Alemanha)</i>

*SDS*

*Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)*

*Sistema VarioMACS*

*Miltenyi Biotec Inc. (Bergisch-Gladbach, Alemanha)  
e Becton-Dickinson (Oxford, Reino Unido)*

Os eosinófilos estão envolvidos no processo de defesa do organismo contra infecções parasitárias e na patogênese de doenças alérgicas, imunológicas e neoplásicas. Estudos anteriores demonstraram a existência de uma via funcional NO/GMPc em eosinófilos de rato e humano que modulam a locomoção deste tipo celular. Os nucleotídeos cíclicos são capazes de modular o processo de ativação de leucócitos, mas seu papel na locomoção é ainda controverso. Este estudo foi realizado para investigar os efeitos do 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina-3-il]-pirimidina-4-ilamina (BAY 41-2272) sobre a quimiotaxia de eosinófilos humanos induzida por formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP;  $10^{-7}$  M) e também sobre os níveis de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) e adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Os eosinófilos foram incubados com BAY 41-2272 (0,1-10,0  $\mu$ M) por um período de tempo curto (10 min) ou prolongado (90 min). A exposição dos eosinófilos ao BAY 41-2272 tanto por 10 ou 90 min inibiu acentuadamente a quimiotaxia destas células. Na concentração de 1  $\mu$ M de BAY 41-2272, a inibição da quimiotaxia foi em torno de 50%, independente se as células foram incubadas por 10 ou 90 min com este composto. A exposição dos eosinófilos por 90 min ao BAY 41-2272 (1  $\mu$ M) resultou em significativo aumento dos níveis de GMPc e AMPc ( $7,1 \pm 0,2$  e  $94,8 \pm 1,5$  nM/ $1,5 \times 10^6$  cels, respectivamente) comparado com o protocolo de 10-min ( $3,0 \pm 0,2$  e  $47,3 \pm 1,3$  nM/ $1,5 \times 10^6$  cels, respectivamente). O aumento dos níveis de GMPc produzidos BAY 41-2272 foi abolido pela pré-incubação dos eosinófilos com o inibidor da guanilato ciclase solúvel 1*H*-[1,2,4]-oxidiazol[4,3-*a*] quinoxalin-1-one (ODQ). De acordo com o ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio bromide

(MTT), não foi observado qualquer efeito citotóxico sobre os eosinófilos em nenhuma das condições experimentais utilizadas. Nossos resultados mostram que o efeito inibitório do BAY 41-2272 sobre a quimiotaxia de eosinófilos humanos induzida por fMLP em tempo curto ou prolongado de incubação, é acompanhado por significativa elevação de GMPc e AMPc, mas nós não detectamos uma correlação direta entre a inibição de quimiotaxia e elevação dos níveis de nucleotídeos cíclicos.

Eosinophils are implicated in human defense mechanism against inflammatory disorders such as allergy, immunological and neoplastic diseases. Previous studies demonstrated a functional NO-cGMP pathway in the rat and human eosinophils that modulate the locomotion of this cell type. Cyclic nucleotides are able to modulate the processes responsible for leucocyte activation, but its role on eosinophil locomotion is still controversial. This study was designed to investigate the effects of the 5-cyclopropyl-2 [1-(2-fluoro-benzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine (BAY 41-2272) on formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP;  $10^{-7}$  M)-induced human eosinophil chemotaxis, cyclic guanosine-3',5'-monophosphate (cGMP) and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP) levels. Human eosinophils were exposed to BAY 41-2272 (0.1-10.0  $\mu$ M) for either short (10 min) or prolonged (90 min) time periods. Exposition of eosinophils to BAY 41-2272 for either 10 or 90 min markedly inhibited the eosinophil chemotaxis. At 1  $\mu$ M of BAY 41-2272, inhibition of fMLP-induced eosinophil chemotaxis was about of 50% irrespective if cells were exposed for 10- or 90 min with this compound. Incubation of eosinophils for 90 min with BAY 41-2272 (1  $\mu$ M) resulted in significantly higher cGMP and cAMP levels ( $7.1 \pm 0.2$  and  $94.8 \pm 1.5$  nM/ $1.5 \times 10^6$  cells, respectively) compared with the 10-min protocols ( $3.0 \pm 0.2$  and  $47.3 \pm 1.3$  nM/ $1.5 \times 10^6$  cells, respectively). The BAY 41-2272-induced cGMP increases were abolished by pre-incubation of eosinophils with the soluble guanylate cyclase inhibitor 1*H*-[1,2,4]-oxidiazolo[4,3-*a*] quinoxalin-1-one (ODQ). No eosinophil toxicity was observed in any experimental condition, according to 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

assay. Our findings show that inhibitory effects of fMLP-induced human eosinophil chemotaxis by BAY 41-2272 at short-term or prolonged exposition are accompanied by significant elevations of cGMP and cAMP, but we could not detect a direct correlation between chemotaxis inhibition and elevation of cyclic nucleotide levels.

## ***1. INTRODUÇÃO***

## **1.1. ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO**

Inflamação é a reação do organismo à invasão por agentes infecciosos, danos físicos, químicos ou biológicos. As principais características da resposta inflamatória incluem: (1) vasodilatação, com aumento do calibre dos vasos sanguíneos e conseqüente aumento do fluxo sanguíneo no foco da inflamação; (2) aumento da permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas; e (3) infiltração das leucócitos através das paredes dos vasos sanguíneos até o local do dano tecidual. O grau com que estes eventos se desenvolvem é normalmente proporcional à gravidade da lesão ou à extensão da infecção.

A mobilização adequada dos leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório é um fenômeno importante para a resposta inflamatória e para a defesa do organismo, onde alterações da resposta quimiotática e/ou da capacidade fagocitária de leucócitos tendem a aumentar a gravidade do processo inflamatório (MAGHAZACHI, 2000).

A quimiotaxia é definida como a reação na qual mediadores químicos determinam a direção e a locomoção das células através de um gradiente quimiotático em direção à região de alta concentração destes mediadores (DEVREOTES e ZIGMOND, 1988; WILKINSON, 1994). A resposta morfológica de leucócitos expostos a fatores quimiotáticos compreende a polarização da célula, com o desenvolvimento do lamelipódio na porção anterior, que possui uma membrana franzida na borda, enquanto a porção posterior do lamelipódio se



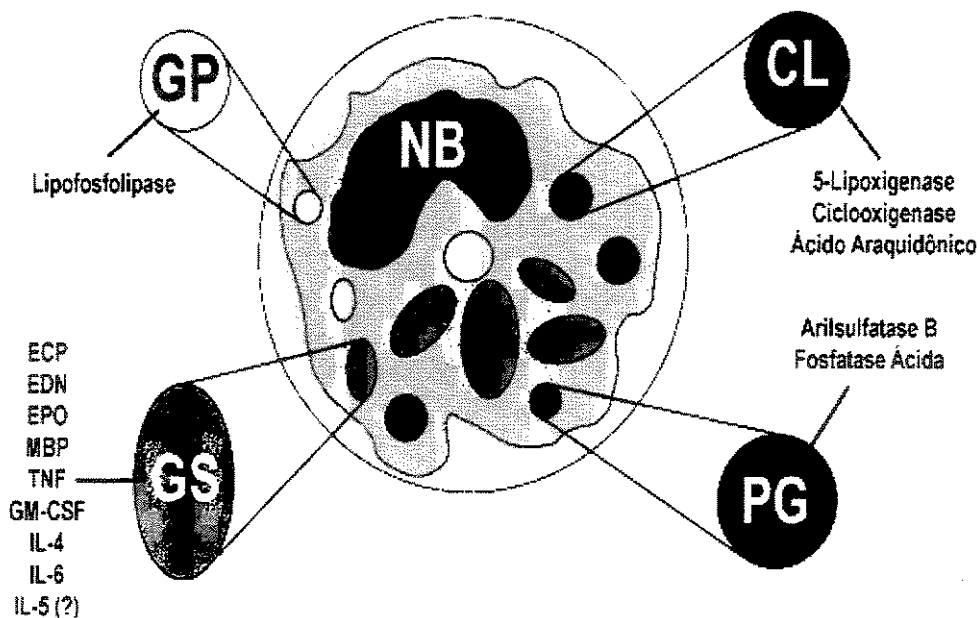
alonga formando o uropódio (SNYDERMAN e GOETZL, 1981; SÁNCHEZ-MADRID e DEL POZO, 1999).

A polimerização e a despolimerização da actina é regulada por proteínas que se ligam à actina, tais como a profilina e a gelsolina, as quais são controladas por fosfoinosítídeos e pela concentração de cálcio intracelular (STOSSEL, 1989; HOWARD et al., 1990). A motilidade celular representa a interação de muitos processos incluindo adesão (dependente de integrina), protusão lamelar (dependente de actina), *de-adhesion* (dependente de integrina) e contração (dependente de actina, e possivelmente miosina) (DOWNEY, 1994).

A maioria dos agentes quimiotáxicos age através de receptores expressos nas membranas plasmáticas. Esta interação conduz a uma série de sinais intracelulares e eventos bioquímicos como, por exemplo, alterações no metabolismo do ácido araquidônico e fosfoinosítídeos, e elevações transitórias nas concentrações intracelulares de cálcio e de nucleotídeos cíclicos (DEVREOTES e ZIGMOND, 1988). Os nucleotídeos cíclicos agem como segundo mensageiros, levando a mudanças no citoesqueleto requeridas para o movimento celular. A adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e a guanosina monofosfato cíclico (GMPc) possuem um papel modulatório na migração de leucócitos, como agentes estimulatórios ou inibitórios (ELFERINK e VANUFFELEN, 1996).

## 1.2. EOSINÓFILOS

Os eosinófilos foram identificados pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1879 (*apud* GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999). Possuem um núcleo bilobado, com cromatina parcialmente condensada, sem nucléolos, e seu aspecto mais característico são os grânulos citoplasmáticos específicos ou secundários, que contêm um cerne cristalóide eletrodenso, envolto por uma matriz menos densa, os quais se coram em alaranjado na presença de corantes ácidos como a eosina. Assim, estas células exibem características que as distinguem de outras células.



**ILUSTRAÇÃO 1** – Principais estruturas do eosinófilo humano. NB=núcleo bilobado; GP=grânulo primário; GS=grânulo secundário; ECP=proteína catiônica do eosinófilo; EDN=neurotoxina derivada do eosinófilo; EPO=peroxidase do eosinófilo; MBP=proteína básica principal; TNF=fator de necrose tumoral; GM-CSF=fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos; IL=interleucina; PG=pequeno grânulo; CL=corpo lipídico. Extraído e adaptado de GIEMBYCZ e LINDSAY (1999).

Há 4 populações distintas de grânulos eosinofílicos, conforme mostrado na Ilustração 1: a) grânulos secundários, os quais são visíveis no estágio promielocítico; estes apresentam muitas proteínas, incluindo a peroxidase do eosinófilo (EPO), fosfatase ácida, arilsulfatase B, e proteínas básicas (ZUCKER FRANKLIN, 1980; WARDLAW et al., 1994); b) pequenos grânulos, os quais são identificados em eosinófilos de tecido, mas não em células circulantes ou da medula óssea. Estes grânulos contêm fosfatase ácida e arilsulfatase B, podendo também conter catalase (PARMLEY e SPICER, 1974; IOZZO et al., 1982; GLEICH et al., 1992); c) grânulos primários, os quais são arredondados, uniformemente eletrodensos, que aparecem no estágio mielocítico de maturação (GLEICH et al., 1992); d) corpos lipídicos, os quais não estão envoltos por membrana e onde se encontra o principal armazenamento de ácido araquidônico. Estes são esféricos, eletrodensos e ocorrem em número aproximado de 5, mas podem aumentar quando as células são ativadas (WELLER, 1991).

Os eosinófilos são granulócitos que se originam das células precursoras da medula óssea e se diferenciam sob o controle de vários fatores de crescimento e fatores estimuladores de colônias derivados dos linfócitos T e das células mesenquimais. Indivíduos sadios contêm na medula óssea cerca de 3% de eosinófilos, dos quais 37% são maduros, sendo o *turnover* de aproximadamente  $2,2 \times 10^8$  células/kg/dia (SPRY, 1993; KROEGEL et al., 1994).

Após um período de maturação e diferenciação, a migração de eosinófilos da medula óssea para o sangue leva cerca de 3,5 dias, passando a circular no sangue periférico, onde apresentam meia-vida de 13-18 horas (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999).

Os eosinófilos estão distribuídos em vários órgãos, mas possuem afinidade por tecidos que apresentam uma interface com o meio externo (gastrointestinal, respiratório, geniturinário, e pele), onde podem persistir por aproximadamente 6 dias (KROEGEL et al., 1994).

A vida dos eosinófilos teciduais pode aumentar pelo efeito de citocinas liberadas local ou sistemicamente, tais como a interleucina (IL)-3 e o fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos (GM-CSF) (OWEN et al., 1987; ROTHENBERG et al., 1988). A IL-5 e, possivelmente, a eotaxina possuem papel fundamental nos estágios de maturação e liberação da medula óssea (CLUTTERBUCK et al., 1989; SANDERSON, 1993; PALFRAMAN et al., 1998). Assim, o GM-CSF, a IL-3 e a IL-5 são importantes na regulação das funções destas células, em particular, na determinação do número de eosinófilos na circulação e nos tecidos através da habilidade dos mesmos de facilitar a produção, proliferação e diferenciação destas células.

Nas últimas duas décadas, novas informações foram obtidas acerca das funções do eosinófilo e de seu papel em doenças humanas, particularmente nos processos inflamatórios. Os eosinófilos sintetizam e liberam várias substâncias pró-inflamatórias incluindo proteínas básicas pré-formadas, como a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica do eosinófilo (ECP), a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) ou a proteína X do eosinófilo (EPX) e a EPO. A MBP, ECP e EPO apresentam efeitos citotóxicos sobre o epitélio respiratório (GLEICH et al., 1995). Além disso, a ECP pode facilitar a entrada de moléculas tóxicas na célula (YOUNG et al., 1986) e a MBP aumenta diretamente a reatividade do músculo liso (JACOBY et al., 1993).

Os eosinófilos também liberam metabólitos tóxicos derivados do oxigênio como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ); metabólitos do ácido araquidônico, incluindo o leucotrieno  $C_4$  ( $LTC_4$ ), prostaglandinas como a  $PGD_2$ ,  $PGE$ ,  $PGF_1$  e  $PGF_{2\alpha}$  e tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ); fator ativador de plaquetas (PAF); neuropeptídeos; fatores de crescimento e citocinas (KANOFISKY et al., 1988; BURKE et al., 1990; GIEMBYCZ et al., 1990; MOQBEL et al., 1991).

Entre as citocinas sintetizadas pelos eosinófilos podemos citar a  $IL-1\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ , GM-CSF,  $IL-3$ ,  $IL-5$ , fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), interferon gama ( $IFN-\gamma$ ) e  $IL-10$  (COSTA et al., 1993; KITA et al., 1991; MOQBEL et al., 1991; DESREUMAUX et al., 1992; BRAUN et al., 1993; MELANI et al., 1993; HAMID et al., 1992; WELLER et al., 1993; LAMKHIOUED et al., 1995, 1996). Foi também demonstrado que eosinófilos provenientes de indivíduos saudáveis possuem informação genética para o fator quimiotático de linfócitos (LCF) e para o RANTES (*regulated on activation, normal T-expressed and secreted*; LIM et al., 1995), enquanto que pacientes portadores de síndrome hipereosinofílica expressam RNAm para a proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa ( $MIP-1\alpha$ ; COSTA et al., 1993).

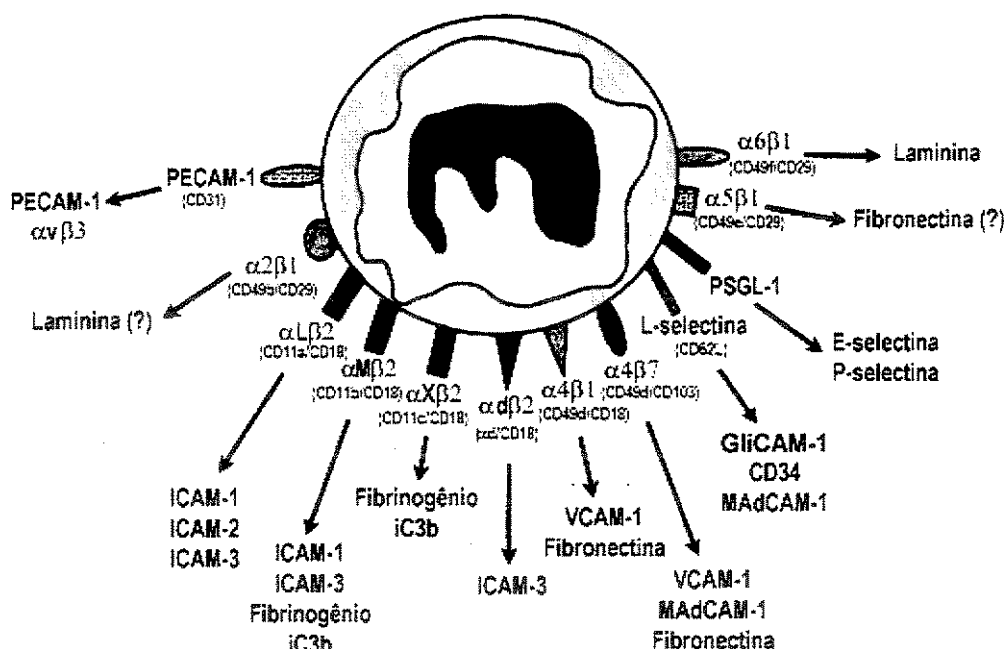
Diversos receptores foram identificados nos eosinófilos. Estes receptores podem se ligar a várias proteínas efetoras, resultando em estimulação ou inibição da resposta celular. Os receptores para fator de ativação plaquetária (PAF), leucotrienos, N-formil-Metionil-Leucil-Lenilalanina (fMLP), quimiocinas, complemento, neuropeptídeos sensoriais, bradicinina, endotelina, adenosina,

histamina, prostanóides,  $\alpha$  adrenoceptores,  $\beta$  adrenoceptores, somatostatina e lipoxinas são do tipo acoplados à proteína G. Os receptores para IL-3, IL-5 e fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) são formados por duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , e a interação com a subunidade  $\beta$  resulta na formação de um complexo ligante-receptor de alta afinidade que desencadeia a sinalização celular. Os eosinófilos também expressam superfamílias de receptores para IFN e TNF, assim como receptores para moléculas de adesão, os quais são importantes para o processo de migração desta célula da circulação sistêmica para os tecidos (GIEMBYCZ e LINDSAY 1999).

Embora o papel dos eosinófilos em tecidos inflamados não esteja completamente elucidado, sabe-se que os mesmos estão implicados em mecanismos de defesa dos hospedeiros em infecções parasitárias e na patogênese das doenças alérgicas (asma brônquica, rinite alérgica e dermatites atópicas), imunológicas (esclerose múltipla, asma brônquica intrínseca) e malignas (carcinoma broncogênico, síndrome hipereosinofílica, doença de Hodgkin) (KROEGEL et al., 1994; BUTTERFIELD et al., 1995; MARTIN et al., 1996). A asma, por exemplo, é caracterizada por inflamação das vias aéreas e hiperreatividade brônquica, na qual diferentes células inflamatórias estão envolvidas, como os mastócitos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, além do aumento da expressão de receptores de quimiocinas ativas para eosinófilos, como eotaxina, RANTES, proteína quimiotática de monócito 3 e 4 (MCP-3 e -4) e MIP-1 $\alpha$ . Entretanto, é a infiltração eosinofílica que a diferencia de outras condições inflamatórias das vias

aéreas (BUSSE e SEDGWICK, 1992; BARNES, 1996; HOLGATE et al., 1997; HUMBERT et al., 1997; LAMKHIOUED et al., 1997; TAHA et al., 1999).

A migração de eosinófilos da circulação sistêmica para os tecidos envolve vários eventos responsáveis pela interação dos mesmos com as células endoteliais, sendo que as moléculas de adesão ou receptores e seus respectivos ligantes possuem um papel central nestes processos (RESNICK e WELLER, 1993; GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999) (Ilustração 2).



**ILUSTRAÇÃO 2** – Moléculas de adesão presentes no eosinófilo e seus respectivos ligantes. CD=cluster of differentiation; PECAM=platelet endothelial cells adhesion molecule; ICAM=intercellular adhesion molecule; VCAM=vascular cell adhesion molecule; GliCAM=glycosylation-dependent, cell adhesion molecule; PSGL=P-selectin glycoprotein ligand. Extraído e adaptado de GIEMBYCZ e LINDSAY (1999).

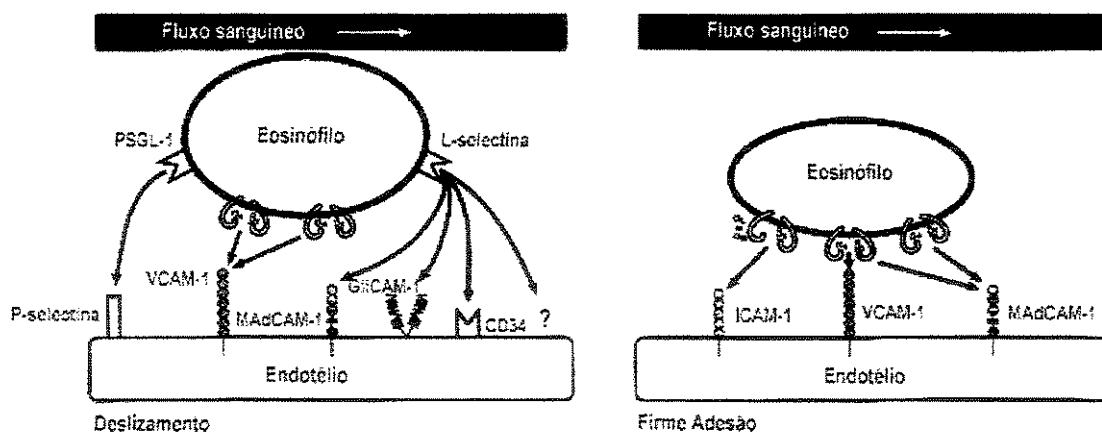
Uma variedade de moléculas de adesão é expressa nos eosinófilos, mas a migração destas células é mediada inicialmente por moléculas de adesão da família das selectinas e seus respectivos ligantes. Existem 3 tipos de selectinas, a saber, *E*, *P* e *L*. As *E*- e *P*-selectinas estão presentes nas células endoteliais e a *L*-

selectina no eosinófilo, além de outros tipos celulares. As *P*- e as *L*-selectinas são constitutivas ao passo que as *E*-selectinas são induzidas por citocinas.

O deslizamento dos eosinófilos circulantes sobre o endotélio é mediado primariamente pela *P*-selectina, a qual é estocada nos corpos citoplasmáticos *Weibel-Palade* das células endoteliais, chegando à membrana plasmática após minutos na presença dos estímulos, onde se liga ao PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*) presente no eosinófilo (Ilustração 3).

Após a ativação celular, os eosinófilos aderem firmemente ao endotélio através das moléculas de adesão da família das integrinas, que incluem as subfamílias CD29 ( $\beta_1$  integrinas), CD18 ( $\beta_2$  integrinas) e CD103 ( $\beta_7$  integrinas).

As integrinas são glicoproteínas heterodímeras com cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . Um importante representante da subfamília  $\beta_1$  é a integrina  $\alpha_4\beta_1$ , conhecida como VLA-4 (*very late antigen 4*; CD49d/CD29), e da subfamília  $\beta_2$  é a integrina  $\alpha_M\beta_2$ , conhecida como Mac-1 (*macrophage-1 antigen*; CD11b/CD18), sendo ambas presentes em eosinófilos.



**ILUSTRAÇÃO 3** – Mecanismo de deslizamento e adesão do eosinófilo: envolvimento de moléculas de adesão. CD=cluster of differentiation; PSGL=P-selectin glycoprotein ligand; VCAM=vascular cell adhesion molecule; GliCAM=glycosylation-dependent, cell adhesion molecule; ICAM=intercellular adhesion molecule;. Extraído e adaptado de BROIDE et al. (1999).



As  $\beta_1$  integrinas (VLA-4) interagem com a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) e alternativamente com a MadCAM-1, enquanto as  $\beta_2$  integrinas (CD18) interagem com a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) expressas em células endoteliais (ROTHENBERG, 1998; BROIDE et al., 1999).

As quimiocinas, citocinas com baixo peso molecular, foram inicialmente caracterizadas com base em seus efeitos quimiotáticos. São capazes de aumentar a adesão de leucócitos às células endoteliais ativadas e de estimular a migração transendotelial, e são produzidas transitoriamente em sítios inflamados (RANDOLPH e FURIE, 1995; ROTH et al., 1995; TESSIER et al., 1997). Em especial, podemos citar a subfamília de quimiocinas CC que possui membros que exercem atividade quimiotática *in vitro*, incluindo o RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 e eotaxina (GALE e McCOLL, 1999). A eotaxina (principalmente a eotaxina-2) é um agente quimiotático potente e seletivo para eosinófilos, basófilos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> (PONATH et al., 1996; FORSSMAN et al., 1997). As ligações das quimiocinas aos seus receptores levam à geração de uma série coordenada de sinais, resultando na geração de segundo mensageiros e ativação de enzimas efetoras (GALE e McCOLL, 1999).

Diversos trabalhos demonstraram que vários mediadores lipídicos estão envolvidos na migração e ativação de eosinófilos, assim como na eosinofilopoese (SANDERSON et al., 1985; FACCIONI et al., 1991; WARRINGA et al., 1991; COLLINS et al., 1993; COEFFIER et al., 1994). Dentre estes, podemos citar o PAF, o leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e a PGD<sub>2</sub> (BUTCHERS e VARDEY, 1990; SPADA et al., 1994; POWELL

et al., 1995; SHINDO et al., 1997). Há evidências que o LTB<sub>4</sub> e o PAF induzem migração eosinofílica *in vivo* e *in vitro* (HAKANSSON et al., 1987; FACCIONI et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1994; SHINDO et al., 1997; SPADA et al., 1997; OHASHI et al., 1998), e também potencializam os efeitos quimiotáticos dos eosinófilos, aumentando a migração induzida por outros quimioatraentes (KOENDERMAN et al., 1991; BLOM et al., 1992). Estudo prévio sugeriu que o LTB<sub>4</sub> é o mediador final da IL-5 e da IL-8 (OLIVEIRA et al., 1996). A inibição de um destes mediadores (LTB<sub>4</sub>, IL-5 ou IL-8) bloqueia completamente a migração eosinofílica induzida por salina, sugerindo que tais mediadores atuam sinergicamente (OLIVEIRA et al., 1996).

Até o momento, não há dados moleculares sobre a natureza do(s) receptor(es) de fMLP expresso(s) em eosinófilos. Apesar de o fMLP provocar uma variedade de efeitos em células isoladas, poucos estudos *in vivo* têm sido realizados. Em cobaias, o fMLP é capaz de evocar quimiotaxia de eosinófilos, sendo este efeito atenuado por antagonista de LTB<sub>4</sub>, inibidor da 5-lipoxigenase e antagonista da Cys-LT<sub>1</sub>, indicando que a habilidade do fMLP em facilitar a migração de eosinófilos da lâmina própria do lúmen aéreo de cobaias é indireta e requer a liberação de LTB<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> (MUNOZ et al., 1997).

A IL-5 é uma citocina produzida por vários tipos celulares, incluindo eosinófilos (BROIDE et al., 1992), a qual induz migração eosinofílica em cobaias, camundongos e humanos (COEFFIER et al., 1991, 1994; WANG et al., 1989; YAMAGUCHI et al., 1988). Além disso, a IL-5 recombinante humana potencializa os efeitos mediados por eosinófilos de cobaia e humano, aumentando desse modo

a migração induzida por diferentes agentes quimiotáticos, bem como a adesão *in vitro* de eosinófilos humano ao endotélio vascular (WALSH et al., 1990).

RAND et al. (1991) mostraram que a IL-2 é quimiotática para eosinófilos de sangue obtido de indivíduos saudáveis ou com hipereosinofilia. A IL-4 é capaz de induzir quimiotaxia de eosinófilos humano em sangue periférico de indivíduos com dermatite atópica, mas não em sangue de indivíduos saudáveis (DUBOIS et al., 1994). A IL-13 também é quimiotática para eosinófilos humano (HORIE et al., 1997). O TNF- $\alpha$  possui um efeito quimiotático discreto (NAGATA et al., 1993), mas é capaz de potencializar a quimiotaxia de eosinófilos induzida por PAF (NAGATA et al., 1993). O fator de crescimento e transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que pode ser produzido pelo eosinófilo e é encontrado em grandes concentrações na secreção de asmáticos, é capaz de induzir quimiotaxia de eosinófilos humanos *in vitro* (LUTTMANN et al., 1998).

### **1.3. GUANILATO CICLASE SOLÚVEL E GMPc**

Os nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc são segundo-mensageiros importantes na transdução de sinais e na regulação de respostas fisiológicas. Os níveis intracelulares destes nucleotídeos cíclicos são controlados por uma complexa família de enzimas denominadas fosfodiesterases (PDEs).

O GMPc é sintetizado por uma família de enzimas denominadas guanilato ciclases particulada e guanilato ciclase solúvel (GCs), as quais possuem algumas

seqüências idênticas de aminoácidos na região catalítica à adenilato ciclase, que é a responsável pela síntese de AMPc (KRUPINSKI et al., 1989).

O GMPc é formado pela ação da GCs, que é uma enzima expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos, e faz a conversão de guanosina trifosfato (GTP) para GMPc. Este 2º mensageiro medeia uma variedade de respostas celulares e fisiológicas, dependendo do tipo de célula e tecido, incluindo relaxamento de músculo liso vascular e não vascular, inibição da adesão e agregação plaquetária e neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico (SZABO e THIEMERMANN, 1995).

O GMPc exerce seus efeitos através da ativação de diferentes efetores como modulação de canais iônicos (BIEL et al., 1999), proteínas quinases dependentes de GMPc ( LOHMANN et al., 1997) e PDEs reguladas por GMPc (JUILFS et al., 1999; FRANCIS et al., 2000).

A GCs é um heterodímero composto de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (HOBBS, 1997), sendo que cada subunidade pode ser dividida em três domínios funcionais: domínio de ligação heme, região de dimerização e domínio catalítico. O domínio de ligação heme está localizado no N-terminal de cada subunidade (GERZER et al., 1982; IGNARRO et al., 1982; OHLSTEIN et al., 1982). A expressão das duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , é necessária para a atividade catalítica desta enzima (HARTENECK et al., 1990; BUECHLER et al., 1991). A análise da GCs de diferentes tecidos demonstrou a existência de múltiplas isoformas com diferentes composições de subunidades. As subunidades mais abundantes são  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ , e estão presentes na maioria dos tecidos (BRAUGHLER et al., 1979).

#### **1.4. ÓXIDO NÍTRICO: SÍNTESE E AÇÕES FISIOLÓGICAS**

FURCHGOTT e ZAWADZKI (1980) demonstraram que em resposta à acetilcolina, as células endoteliais liberavam um fator não prostanoíde denominado fator de relaxamento derivado de endotélio (EDRF), que causava relaxamento de músculo liso. Evidências biológicas e clínicas demonstraram posteriormente que o EDRF é o óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador (IGNARRO, ET AL., 1987).

O NO é o ativador endógeno da GCs e é atualmente considerado um biomensageiro de ampla distribuição e existente em uma grande variedade de organismos (HOBBS e IGNARRO, 1996). O NO é sintetizado a partir de um dos átomos de nitrogênio do grupo guanidino terminal da L-arginina (PALMER et al., 1988), por meio da ação de uma família de enzimas coletivamente conhecidas como óxido nítrico sintases (NOSs) que possuem grande homologia com o citocromo P-450 redutase (BREDT et al., 1991) e se apresentam em 3 isoformas: neuronal (nNOS ou NOS tipo I), induzível (iNOS ou NOS tipo II) e endotelial (eNOS ou NOS tipo III) (LAMAS et al., 1992).

Todas as isoformas são homodímeras, sendo que cada monômero contém sítios de ligação para nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida; NADPH), flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), calmodulina (CaM), tetrahydrobiopterina ( $H_4B$ ) e um grupo heme (HEVEL et al., 1991; GROVES e WANG, 2000). Cada monômero contém um domínio oxigenase no final do terminal amino e um domínio redutase no final do terminal carbóxi.

Em mamíferos, o NO participa de numerosas funções na sinalização inter e intracelular, incluindo dilatação dos vasos sangüíneos, transmissão neuronal, toxicidade contra patógenos e tumores, coordenação do ritmo cardíaco e regulação da atividade respiratória celular (GROVES e WANG, 2000). O NO é também sintetizado e liberado por uma variedade de células inflamatórias incluindo macrófagos (MARLETTA et al., 1988), leucócitos polimorfonucleares (RIMELE et al., 1988; SALVEMINI et al., 1989; SCHMIDT et al., 1989), células mononucleares (SALVEMINI et al., 1989) e plaquetas (SETHI e DIKSHIT, 2000).

Em uma grande variedade de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, o NO têm sido descrito como capaz de modular reações inflamatórias agudas e crônicas. De modo geral, a ação do NO ocorre através da ativação da GCs e subsequente produção de GMPc. Por essa razão, a maioria dos efeitos biológicos provocados pelo NO é mediado pelo GMPc, o qual atua como segundo mensageiro (MURAD, 1986).

O NO apresenta duas categorias de efeitos: diretos e indiretos. O efeito direto é aquele onde o NO age diretamente sobre a GCs ao ligar-se ao grupo heme formando um complexo heme-ferroso-nitrosil (MURAD, 1994; WINK e MITCHELL, 1998). Os efeitos indiretos são aqueles provenientes da reação do NO com o ânion superóxido (ou com o oxigênio) levando à formação de espécies reativas de óxido de nitrogênio, podendo levar à formação de intermediários altamente reativos, como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), cujos mecanismos citotóxicos incluem a nitração de proteínas, peroxidação lipídica, inibição de vias metabólicas e processos de transdução de sinal celular e quebra da fita de DNA (BECKMAN e KOPPENOL, 1996; BECKMAN, 1996). O ONOO<sup>-</sup> é formado em tecidos inflamados onde o

aumento da produção de NO e O<sub>2</sub> favorece sua reação (ISCHIROPOULOS et al., 1992; BECKMAN, 1994). O ONOO<sup>-</sup> (ou um de seus intermediários reativos) pode reagir com compostos fenólicos como a tirosina para formar produtos da nitração como a 3-nitrotirosina (ISCHIROPOULOS et al., 1992; VAN DER VLIET et al., 1995).

## **1.5. VIA NO-GMP<sub>c</sub> E INFLAMAÇÃO EXPERIMENTAL**

### **1.5.1. Estudos *in vivo***

FERREIRA et al. (1996) demonstraram principalmente que o tratamento crônico de ratos com o inibidor da NOS, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), inibe a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal em resposta a vários agentes inflamatórios como o PAF, bradicinina, carragenina e LPS, e inibe a quimiotaxia de eosinófilos peritoneais, *ex vivo* estimulados com fMLP. Resultados semelhantes foram obtidos em modelo de inflamação alérgica das vias aéreas de ratos, onde o o tratamento crônico dos animais com L-NAME resultou em diminuição significativa do influxo de eosinófilos (FERREIRA et al., 1998). Estudos posteriores também mostraram que o tratamento agudo de camundongos e ratos alérgicos com o inibidor não seletivo, L-NAME resulta em inibição da influxo de eosinofílico para as vias aéreas (FEDER et al., 1997; IJIMA, et al., 2001; BIRREL et al., 2003).

### 1.5.2. Estudos *in vitro*

Estudos prévios demonstraram que inibidores não seletivos da NOS como Ng-monometil-L-arginina (NMA) e L-NMMA atenuam a migração *in vitro* de neutrófilos estimulados por fMLP, sendo este efeito revertido pela adição de análogos do GMPc e da L-arginina ou doador de NO, como o nitroprussiato de sódio (KAPLAN et al., 1989; BELENKY et al., 1993 a,b). Trabalhos anteriores demonstraram que agentes como ácido ascórbico, carbamilcolina e serotonina aumentavam os níveis de GMPc e quimiotaxia de monócitos e células PMN (SANDLER et al., 1975; GOETZL et al., 1974; ESTENSEN et al., 1973).

Em eosinófilos peritoneais de rato, o bloqueio da NOS por inibidores mais seletivos da NOS como 2-amino-5,6-dihidro-6metil-4H-1,3-tiazina (AMT), seletivo para iNOS, e 1-(2-trifluorometilfenil) imidazol (TRIM), seletivo para nNOS e iNOS, e não seletivos como L-NAME resultou em inibição da quimiotaxia eosinofílica induzida pelo fMLP e LTB<sub>4</sub>, sendo a inibição revertida por doador de NO e pelo análogo do GMPc, o dibutiril GMPc. De modo semelhante, o 1-H-[1, 2, 4] oxadiazolo quinoxalin-1-one (ODQ), inibidor da GCs, inibiu a migração dos eosinófilos de ratos, reforçando a afirmação que o NO modula a quimiotaxia de eosinófilos por mecanismo dependente da via do GMPc (ZANARDO et al., 1997).

Estudos recentes demonstraram pela primeira vez a existência de uma via funcional NO/GMPc em eosinófilos humanos que modula a quimiotaxia e a adesão deste tipo celular (CONRAN et al., 2001; THOMAZZI et al., 2001). Estes estudos mostraram, de modo geral, que o bloqueio da via NO/GMPc (com L-NAME e ODQ)



resulta em inibição da quimiotaxia e aumento da adesão, sugerindo que o NO possa exercer efeitos tanto estimulatórios como inibitórios sobre os eosinófilos, dependendo do modelo em estudo. Similarmente aos eosinófilos de ratos (ZANARDO et al., 1997), em eosinófilos humano, a inibição exercida pelo ODQ na quimiotaxia induzida por fMLP é revertida pela adição de dibutilil GMPc, confirmando que este segundo mensageiro exerce papel pró-inflamatório essencial na migração de eosinófilos (THOMAZZI et al., 2001).

Contrariamente a estes resultados, estudo recente demonstrou que doadores de NO como o SNP, 3-morfolinossidnonimina (SIN-1) e S-nitroso-*N*-acetilpenicilina (SNAP) apresentam efeitos inibitórios semelhantes sobre a quimiotaxia de eosinófilos humano *in vitro* estimulados pelo fMLP, independente se os eosinófilos foram expostos por período de tempo curto (10 min) ou prolongado (90 min) a estes doadores (THOMAZZI et al., 2004). Observou-se que os níveis de GMPc nestas células aumentam de forma significativa, concentração-dependente, em ambos os tempos de exposição; entretanto os níveis de GMPc alcançados com a exposição prolongada foram marcadamente maiores do que o decorrente da exposição curta. Levando-se em consideração que a inibição da quimiotaxia é semelhante na exposição prolongada e curta dos doadores de NO, sugeriu-se que o efeito inibitório sobre a quimiotaxia não está diretamente relacionado com a elevação adicional dos níveis de GMPc. O mecanismo responsável por estes efeitos antagônicos entre aumento dos níveis de GMPc e diminuição da quimiotaxia em eosinófilos não é ainda completamente entendido, sendo necessário mais estudos para se poder entendê-los.

## **1.6. ADENILATO CICLASE E INFLAMAÇÃO**

O AMPc é um nucleotídeo cíclico sintetizado no interior da célula a partir da adenosina trifosfato (ATP), sob a ação da adenilato ciclase. Na maioria das células inflamatórias, a elevação das concentrações de AMPc está associada com a supressão de algumas respostas celulares, incluindo desgranulação, liberação de mediadores e quimiotaxia (UNDEM et al., 1990). A elevação dos níveis intracelulares de AMPc pode ocorrer através da ativação da adenilato ciclase, tanto diretamente ou através da ligação apropriada a receptores de membrana, assim como pela prevenção da hidrólise de AMPc pelas fosfodiesterases (EZEAMUZIE, 2001). A adenilato ciclase pode ser ativada por certos agentes, incluindo a forskolina, prostaciclina ( $PGI_2$ ) e prostaglandina  $E_2$ . A  $PGI_2$  aumenta os níveis de AMPc e inibe a quimiotaxia de eosinófilos em cobaia (ITOH et al., 1993).

O AMPc é convertido pelas PDEs à 5'- adenosina monofosfato acíclico (5'-AMP) que é inativo. Várias famílias de PDEs foram identificadas, a  $PDE_4$  é descrita mais específica para AMPc e é encontrada nas células inflamatórias, no músculo liso das vias aéreas, e no endotélio vascular. A inibição da atividade das PDEs causa um aumento nos níveis de AMPc e conseqüente ativação das proteínas quinases que são ditas responsáveis pela inibição da liberação de mediadores tóxicos pelas células inflamatórias (NICHOLSON e SHAHID, 1994). Os inibidores da  $PDE_4$  demonstraram potente atividade anti-inflamatória em modelos animais (TEIXEIRA et al., 1996). O rolipram inibiu a produção de  $TNF\alpha$  por células mononucleares em modelo animal de choque séptico (SEMMLER et al., 1993) e

inibe a produção de ânion superóxido em eosinófilos induzida por fMLP (TORPHY et al., 1994). Além disso, foi demonstrado em eosinófilos de rato que a indução da quimiotaxia pelo LTB<sub>4</sub> e PAF pode ser prevenida pelos inibidores da PDE<sub>4</sub> Ro 20-1724 e rolipram ou forskolin, os quais induziram aumento nos níveis de AMPc (ALVES et al., 1996). Outro estudo demonstrou que a teofilina, rolipram e prostaglandina E<sub>2</sub> inibiram a quimiotaxia de eosinófilos humanos estimulados com PAF e complemento 5a (TENOR et al., 1996).

Dentre os trabalhos in vivo, foi demonstrado que o rolipram e Ro 20-1724, inibem a infiltração de eosinófilos no pulmão de cobaias induzido pela injeção de IL-5 ou exposição ao PAF (LAGENTE et al., 1994; 1995).

SULLIVAN et al. (1994) demonstraram que pacientes asmáticos atópicos tratados cronicamente com baixas doses do inibidor inespecífico de fosfodiesterase, teofilina, reduz o número de eosinófilos ativados presentes na parede brônquica após a estimulação com antígeno.

## **1.7. NOVOS COMPOSTOS ATIVADORES DA GCs INDEPENDENTES DE NO**

Nos últimos anos, uma nova classe de substâncias tem sido descrita como capaz de ativar a GCs por um mecanismo independente de NO. Esta nova classe de compostos tem como precursor o YC-1 que é capaz de ativar diretamente a GCs devido ao seu acoplamento a um sítio regulatório da enzima, independente do sítio regulatório e ligação do NO (KO et al., 1994; WU et al., 1995). Este composto

se liga a um sítio alostérico da enzima, nas cisteínas 238 e 243 da subunidade  $\alpha_1$  da enzima. Esta região da GCs modula sua atividade catalítica e a resposta ao ligante acoplado ao grupamento heme, podendo ser intensificada na presença do NO (BECKER et al., 2001; MARTIN et al., 2001; STASCH et al., 2001; BRIONI et al., 2002; MÜLSCH et al., 1997).

Trabalhos realizados com anéis aórticos de coelho e cultura de células endoteliais de aorta bovina demonstraram que o YC-1 é capaz de aumentar os níveis de GMPc. Na presença do L-NAME, o efeito máximo do YC-1 é somente parcialmente diminuído, indicando que o YC-1, além de estimular a GCs em sítio diferente do NO, também estimula a síntese e liberação de NO endógeno das células endoteliais devido à ativação da NOS exercendo uma ação sinérgica sobre a GCs (WOHLFART et al., 1999). O YC-1 também aumenta os níveis de GMPc em células cromafins e células endoteliais adrenomedulares, sendo sua ação bloqueada pelo o ODQ (FERRERO e TORRES, 2001).

Recentemente, foi descrito o perfil farmacológico de um novo estimulador da GCs, o BAY 41-2272, e o seu análogo, BAY 41-8543, os quais são descritos como os mais promissores dentre mais de 2000 derivados sintetizados. São moléculas com características e mecanismos similares ao YC-1, sendo, porém, mais potentes (STASCH et al., 2001, 2002).

Experimentos *in vitro* demonstraram que o BAY 41-2272 ativa a GCs nas concentrações de 0,1 nM a 100  $\mu$ M. Esta estimulação é potencializada na presença de doadores de NO (2-(N,N-dietilamino)-diazendate-2-oxide e SIN-1) e revertido pelo ODQ (STASCH ET AL., 2001; STRAUB et al, 2001). Em estudos com a

enzima GCs desprovida de grupamento heme, o BAY 41-2272 não foi capaz de ativá-la, demonstrando que seu mecanismo de ação é NO-independente, porém heme-dependente (STASCH et al., 2001).

A incubação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos com BAY 41-2272 aumentou significativamente os níveis intracelulares de GMPc (CONNELLY et al., 2003).

O BAY 41-2272 é também um potente ativador da GCs em plaquetas humanas, sendo capaz de inibir os efeitos agregantes induzidos pelo colágeno, sem interferir com aquele induzido pela trombina (STASCH et al., 2001, 2002).

O BAY 41-2271 promove potente relaxamento de musculatura lisa de anéis de aorta e artéria safena de coelhos *in vitro*. Quando administrado oralmente em ratos, o BAY 41-2272 produziu, no longo prazo, diminuição da pressão arterial média em animais hipertensos e normotensos (STASCH et al., 2001, 2002; STRAUB et al., 2002). O BAY 41-2272 também induz relaxamento *in vitro* de corpo cavernoso de coelho e humano (KALSI et al., 2003; BARACAT et al., 2003), tecido vaginal e clitoral de coelhos (CELLEK, 2003) e promove ereção peniana em coelhos (BISCHOFF et al., 2003). Este composto é ainda capaz de prolongar o tempo de sangramento em ratos (STASCH et al., 2001), e em modelo de insuficiência cardíaca congestiva em cães, o BAY 41-2272 aumenta o débito cardíaco e preserva a taxa de filtração glomerular, sem induzir ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (BOERRIGTER et al., 2003).

Em trabalho recente, HWANG et al. (2003) observaram que a inibição do *burst* respiratório e desgranulação de neutrófilos humanos pelo YC-1, não ocorre através da ativação da via dependente de GMPc, mas sim da via dependente de

AMPc/proteína quinase A (PKA). Isto sugere a existência de um outro mecanismo de sinalização intracelular desencadeado por estes novos ativadores da GCs.

### **1.8. OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivo geral avançar os estudos sobre o papel do GMPc na migração *in vitro* de eosinófilos humano, usando, para tanto, o BAY 41-2272, composto capaz de elevar os níveis intracelulares de GMPc por mecanismo independente de NO.

Os objetivos específicos foram:

1. Investigar o efeito do BAY 41-2272 sobre a quimiotaxia *in vitro* de eosinófilos induzida pelo fMLP;
2. Investigar o efeito do BAY 41-2272 sobre as concentrações intracelulares de GMPc e AMPc em eosinófilos.

## ***2. MATERIAIS E MÉTODOS***

## **2.1. AMOSTRAS DE SANGUE**

Para a realização deste estudo, nosso trabalho foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (parecer nº 049/2002).

Sangue venoso, obtido de voluntários sadios, com idade de 20 a 60 anos de ambos os sexos, os quais não faziam uso de qualquer medicação, foi coletado e adicionado ao citrato de sódio 3,13% (1:10) para os ensaios de quimiotaxia, dosagens de GMPc e de AMPc, e atividade celular como descrito abaixo.

## **2.2. OBTENÇÃO DE EOSINÓFILOS**

### **□ Isolamento de Eosinófilos**

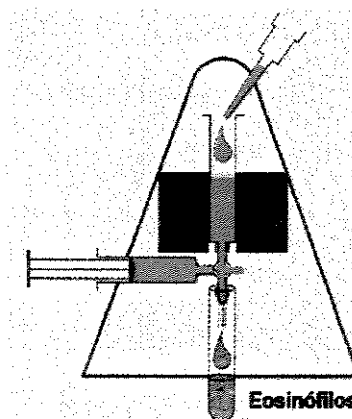
O sangue coletado (120 mL) foi inicialmente diluído (1:1; v/v) em salina tamponada (PBS, pH 7,2-7,4). Aliquotas de 35 mL de sangue diluído foram delicadamente colocadas sobre 15 mL de gradiente de densidade, constituída de Percoll (9,5 mL), água (4,0 mL) e solução de *Hanks* concentrado 10 vezes (1,5 mL), com densidade  $1,082 \pm 0,005$  g/mL, pH 7,4 e osmolaridade 340 mOs/kg H<sub>2</sub>O, em um tubo plástico graduado de 50 mL. Após a centrifugação (20 min; 1000xg; 4°C), o plasma e a camada de células mononucleares junto à interface foi removida e descartada. O sedimento contendo eritrócitos, neutrófilos e eosinófilos foi aspirado e colocado em tubo limpo. Para lisar os eritrócitos foram adicionados



5 volumes de solução isotônica de cloridrato de amônia gelada ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155 mM,  $\text{KHCO}_3$  10 mM e EDTA 0,1 mM) para 1 volume do sedimento e os tubos foram mantidos à 0°C por 13 min. Após a lise, a suspensão celular foi centrifugada por 10 min à 500xg e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo neutrófilos e eosinófilos foi lavado (10 min; 500xg; 4°C) e ressuspenso com PBS. A suspensão celular foi então submetida a separação imunomagnética de células, conforme descrito abaixo.

#### ▣ Separação Imunomagnética de Células

Utilizamos o sistema magnético de separação celular (MACS) para separar eosinófilos, conforme descrito por HANSEL et al. (1991). O sistema é composto por um adaptador de magneto de ferro (tipo  $\text{VS}^+$ ) que permite acoplar uma coluna de separação contendo uma matriz de fibras de aço (tipo CS; volume da matriz de 6,3 mL) e uma agulha hipodérmica 21 g (Ilustração 4). Anteriormente ao uso, a coluna foi



**ILUSTRAÇÃO 4** – Coluna de separação imunomagnética MACS. Extraído e adaptado do manual de instruções do fabricante.

lavada 4 vezes com PBS/albumina de soro bovino (BSA) 0,5% e, em seguida, incubada com esta mesma solução à temperatura ambiente por 1 h. Alguns minutos antes de receber a suspensão celular, a coluna foi resfriada através de 4 lavagens com PBS/BSA 0,5% gelado.

#### □ Seleção Imunomagnética Negativa de Eosinófilos

A suspensão celular de neutrófilos/eosinófilos e *microbeads* contendo CD16 aderido foi incubada por 30 min a 6-12°C, com suave agitação, sendo utilizados 32  $\mu\text{L}$  de *microbeads* para cada  $5 \times 10^7$  de células. PBS/BSA 0,5% gelado (q.s.p. 1 mL) foi então adicionado à suspensão de células, a qual foi transferida para o alto da coluna de separação, sob o campo magnético. Abrindo totalmente a torneira de 3 vias junto à base da coluna, a suspensão celular passou através da lima de aço da mesma. Foram adicionados sucessivamente mais 3 volumes (1 mL) de tampão PBS/BSA 0,5% e em seguida esta mesma solução foi adicionada em volume maior por meio de uma seringa de 10 mL. As células CD16<sup>+</sup> (neutrófilos) ficaram presas à coluna ao passo que as células CD16<sup>-</sup> (eosinófilos) foram coletadas em 2 tubos de 15 mL (volume de eluição de 30 mL) e centrifugadas (10 min; 500xg; 4°C), ressuspensas e contadas. A coluna foi então removida do campo magnético e os neutrófilos aderidos magneticamente foram retirados e desprezados.

#### □ Contagem de Células

A determinação total de células foi realizada utilizando câmara de *Neubauer*. Para a contagem diferencial das células foram preparadas lâminas na citocentrífuga contendo  $2 \times 10^5$  células/lâmina ( $2 \times 10^6$  céls/mL; 100  $\mu\text{L}$ ; 1800xg; 10 min) e posteriormente coradas com May-Grünwald-Giemsa, e contadas em microscópio óptico. Um mínimo de 500 células foram contadas e classificadas

como neutrófilos, eosinófilos e mononucleares, baseadas no critério morfológico normal. As células foram então ressuspensas na concentração desejada, dependendo do ensaio a ser realizado posteriormente.

Em todos os experimentos realizados obtivemos um grau de pureza superior a 98%, sendo a rara contaminação ocasionada por neutrófilos (0-2%) e monócitos (0-2%). A viabilidade dos eosinófilos observada no método de exclusão pelo Azul de Trypan sempre foi superior a 95%. Em cada purificação conseguíamos uma suspensão celular contendo de 1 a  $3 \times 10^7$  eosinófilos.

### **2.3. ENSAIO DE QUIMIOTAXIA IN VITRO**

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados utilizando câmara de microquimiotaxia com 48 poços (RICHARDS e MCCULLOUGH, 1984). Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de eosinófilos ( $5 \times 10^6$  células/mL de meio mínimo essencial de *Eagle* - MEM) tratadas ou não com BAY 41-2272 (0,1, 1,0 e 10  $\mu\text{M}$ ), foram colocadas no compartimento superior da câmara e 28  $\mu\text{L}$  do agente quimiotático (fMLP;  $1,0 \times 10^{-7}$  M) colocados no compartimento inferior. Os dois compartimentos foram separados com filtro de policarbonato com poro de 5  $\mu\text{m}$  (Nuclepore Pleasanton, CA, EUA). A migração espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotático por 28  $\mu\text{L}$  de MEM. Após incubação por 1 h à 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (ar úmido), os filtros foram retirados das câmaras e fixados em metanol 70% por 2 min, corados (Diff-Quik®; Baxter Healthcare Corporation, EUA) e colocados sobre lâminas de microscopia. A

migração dos eosinófilos foi determinada quantificando o número de células que migraram através do filtro (que migraram totalmente, chegando ao lado inferior do filtro), em 5 campos aleatórios, através de microscópio com objetiva de imersão. Em cada experimento, os ensaios foram realizados em triplicata e cada protocolo foi realizado 4 vezes (n=4).

## **2.4. DOSAGEM DE GMPc E AMPc**

### **□ Extração de GMPc e AMPc**

Para extração de GMPc e AMPc utilizamos o mesmo método. Os eosinófilos foram isolados como descrito anteriormente (item 2.2.) e ressuspensos em PBS numa concentração final de  $1 \times 10^7$  células/mL. Em seguida, os eosinófilos foram incubados com o inibidor inespecífico de fosfodiesterase, 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 2 mM) por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, os eosinófilos foram incubados com BAY 41-2272, nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10  $\mu$ M por 10 ou 90 min, 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar úmido.

Em protocolos separados, os eosinófilos foram pré-incubados por 10 min com o inibidor da guanilato ciclase solúvel ODQ (0,2 mM), antes da adição de BAY 41-2272, para ensaio de dosagem de GMPc. O ativador da adenilato ciclase iloprost (3  $\mu$ M) foi utilizado como controle positivo nos ensaios de dosagem de AMPc. A incubação foi interrompida pela adição de etanol absoluto acidificado (67%) gelado, e as amostras foram agitadas manualmente com vigor por

aproximadamente 30 seg. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas à 3000xg, 4°C, por 30 min.

Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e reservados, sendo os precipitados lavados com 0,5 mL de etanol acidificado (67%) gelado, centrifugados novamente a 14000xg à temperatura ambiente por 5 min e estes sobrenadantes foram adicionados aos primeiros.

As amostras foram secas à 55-60°C em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio, e estocadas a -20°C até a dosagem.

#### □ **Dosagens de GMPc e AMPc**

As dosagens dos níveis de GMPc e AMPc foram realizadas utilizando os Kits comerciais Cayman específicos para GMPc ou AMPc, seguindo as instruções do fabricante. O método imunoenzimático é baseado na competitividade do GMPc ou AMPc livre com o GMPc ou AMPc marcado (ligado a uma molécula de acetilcolinesterase). A intensidade da cor determinada pelo espectrofotômetro é proporcional ao GMPc ou AMPc marcado ligado a cada poço e inversamente proporcional ao GMPc ou AMPc livre formado durante a incubação. As amostras para medida de GMPc (mas não de AMPc) foram previamente acetiladas, de acordo com as recomendações do fabricante. Cada poço recebeu material proveniente de  $1,5 \times 10^6$  células (50  $\mu$ L), e cada amostra foi realizada em triplicata. A leitura foi realizada a 412 nm (PRADELLES e GRASSI, 1989; MAXEY et al., 1992).

## 2.5. ENSAIO DE ATIVIDADE CELULAR PELO MTT

O método de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico] foi originalmente descrito por MOSMANN (1983) e pode ser utilizado para medir citotoxicidade, proliferação e ativação celular. Trata-se de um ensaio colorimétrico que baseia-se na redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas, e tem sido usado como uma alternativa para as técnicas radioativas. A reação produz o sal formazan que é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos.

Adaptamos o ensaio de MTT descrito por RIBEIRO-DIAS et al. (2000), onde usamos uma suspensão de eosinófilos na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Inicialmente, os eosinófilos foram incubados com o BAY 42-2272 em concentrações de 0,1, 1,0 e 10  $\mu$ M, ou com o veículo, por 10 ou 90 min à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar úmido.

Após os períodos de incubação, adicionamos 100  $\mu$ L/poço das amostras de células tratadas com BAY 41-2272 ou veículo e 10  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL em PBS), em triplicata, a uma placa de 96 poços. As placas foram então incubadas por 3 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em ar úmido. Em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L de SDS 10% em HCl 0,01 M por poço e as placas foram incubadas novamente por 18 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em ar úmido, no final da qual realizamos a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm.

## **2.6. PROTOCOLOS DE INCUBAÇÃO DO BAY 41-2272 EM EOSINÓFILOS**

### **▪ Protocolos de 10 min de incubação**

Para o ensaio de quimiotaxia, a suspensão de eosinófilos foi previamente mantida por 20 min a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em ar úmido e posteriormente incubada por 10 min com o BAY 41-2272 (0,1, 1,0 e 10 µM) ou veículo. Em seguida a suspensão celular foi lavada (centrifugação à 500xg; 4°C; 10 min) e ressuspensa em igual volume de MEM/ ovalbumina (OVA). Em seguida, as amostras de células tratadas foram colocadas na câmara de quimiotaxia que foi incubada por 60 min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ar úmido). Para o ensaio de MTT, seguimos o mesmo procedimento acima, no entanto, as células foram ressuspensas em PBS. Para os ensaios de extração de GMPc e AMPc, as células foram ressuspensas em PBS, após o qual permaneceram em temperatura ambiente por 30 min enquanto eram incubadas com IBMX e posteriormente foram incubadas por 10 min com o BAY 41-2272 (0,1, 1,0 e 10 µM) ou veículo.

### **▪ Protocolos de 90 min de incubação**

Para o ensaio de quimiotaxia, os eosinófilos foram incubados por 30 min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ar úmido) com o BAY 41-2272 (0,1, 1,0 e 10 µM) ou veículo. Em seguida, a suspensão celular foi submetida à quimiotaxia por 60 min (37°C, 5%

CO<sub>2</sub>, ar úmido) perfazendo um total de 90 min de exposição à droga. Para o ensaio de MTT e extração de GMPc e AMPc, as células formam ressuspensas em PBS e posteriormente incubadas com BAY 41-2272 ou veículo por 90 min.

O controle dimetil sulfóxido (DMSO), diluente do BAY 41-2272, foi utilizado na concentração de 0,7%, relativo à maior concentração deste composto.

## **2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias (EPM) de  $n$  experimentos. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações seguido pelo teste de Tukey, ou teste  $t$  de *student* não pareado quando apropriado. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.



### ***3. RESULTADOS***

### **3.1. EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE A QUIMIOTAXIA DE EOSINÓFILOS ESTIMULADOS COM fMLP**

Na concentração de  $1 \times 10^{-7}$ , o fMLP induziu migração significativa de eosinófilos em relação à migração espontânea (Figura 1). Entretanto, a quimiotaxia induzida pelo fMLP no protocolo de 90 min de incubação foi significativamente maior que a de 10 min ( $P < 0,001$ ).

A incubação dos eosinófilos por 90 min com BAY 41-2272, nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10  $\mu\text{M}$  ( $37^\circ\text{C}$ ; 5%  $\text{CO}_2$ , em ar úmido), inibiu de forma significativa e concentração-dependente a migração evocada pelo fMLP ( $P < 0,001$ ; Figura 1). O veículo DMSO 0,7% não apresentou efeito significativo sobre a quimiotaxia de eosinófilos estimulados pelo fMLP comparado à células não tratadas ( $20,6 \pm 1,1$  e  $22,5 \pm 1,5$  eosinófilos/campo, para células tratadas e não tratadas com DMSO, respectivamente).

No protocolo de 10 min de incubação, o BAY 41-2272 (1,0  $\mu\text{M}$ ) também reduziu significativamente a quimiotaxia estimulada pelo fMLP ( $P < 0,001$ ; Figura 1). Esta redução (55,92%) foi igual àquela observada no protocolo de 90 min (50,77%) para a concentração de 1  $\mu\text{M}$  de BAY 41-2272.

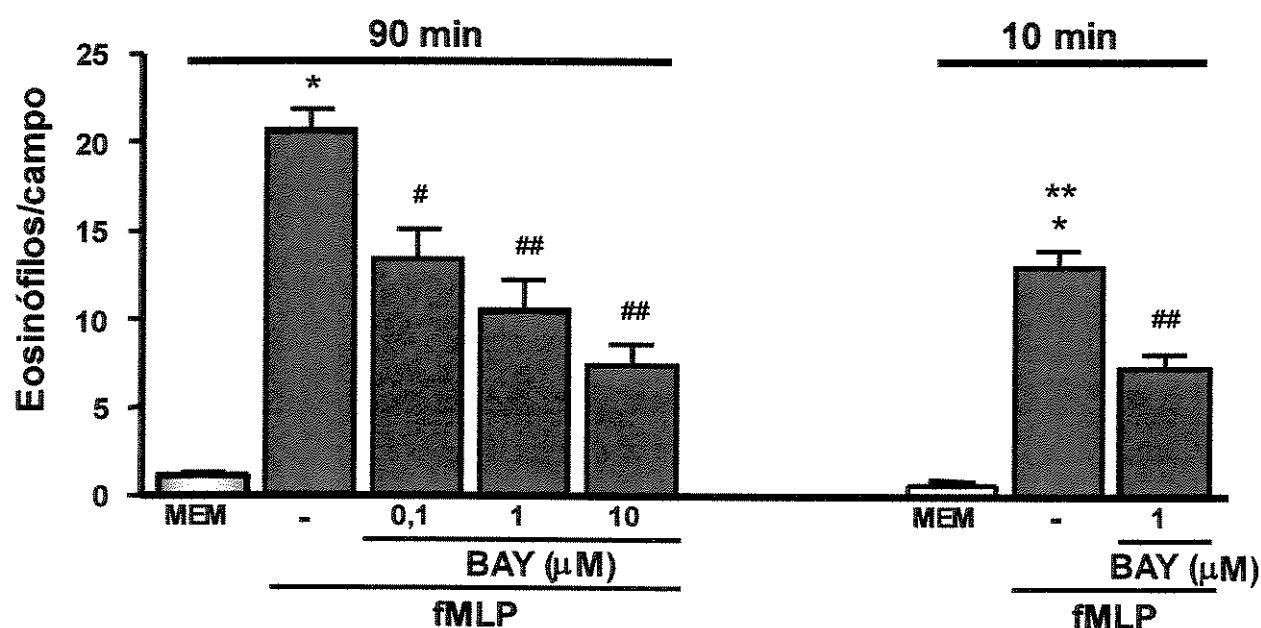


Figura 1 – Efeitos do BAY 41-2272 sobre a quimiotaxia de eosinófilos estimulados pelo fMLP. A suspensão de eosinófilos humanos ( $5 \times 10^6$  cél/mL) foi incubada por 90 ou 10 min com BAY 41-2272 em concentrações de 0,1, 1,0 e 10  $\mu$ M. O controle da migração (fMLP  $1 \times 10^{-7}$  M) é representado pela coluna vermelha, enquanto que a quimiotaxia espontânea (onde o fMLP é substituído por MEM) é representada pela coluna amarela. Cada experimento foi realizado em triplicata ( $n=4$ ). A migração dos eosinófilos é expressa como a média do número de células migradas por campo. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,001$  comparado ao respectivo MEM; \*\* $P < 0,001$  comparado ao fMLP no protocolo de 90 min; # $P < 0,01$  e ## $P < 0,001$  comparado ao respectivo fMLP.

### 3.2. EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE GMPc

A figura 2 mostra que a incubação dos eosinófilos com BAY 41-2272 (0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ ;  $n=3$ ) por 10 ou 90 min aumentou de forma concentração-dependente os níveis de GMPc intracelular. No entanto, o protocolo de 90 min resultou em aumento significativamente maior comparado com o protocolo de 10 min (94%, 136% e 148% maiores para 0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente). O veículo DMSO (0,7%) não afetou significativamente os níveis intracelulares de GMPc comparado às células não-tratadas, em ambos os protocolos usados.

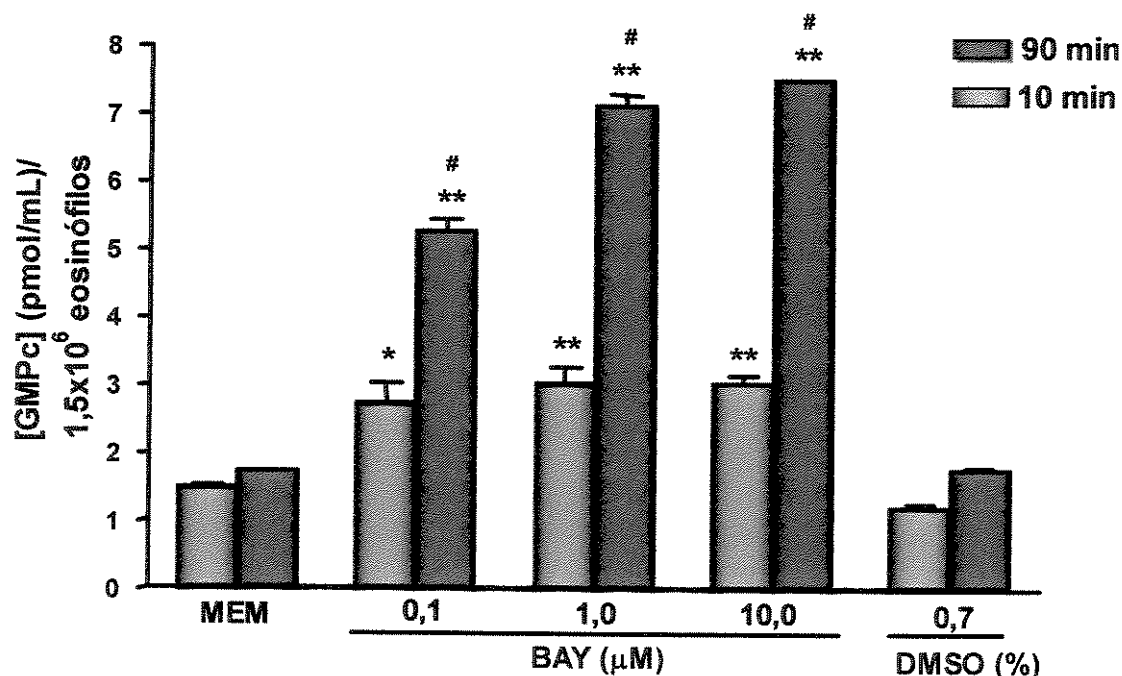


Figura 2 – Efeito do BAY 41-2272 sobre os níveis intracelulares de GMPc em eosinófilos após 10 ou 90 min de incubação. A suspensão de eosinófilos humanos ( $1,5 \times 10^6$  cél./poço) foi incubada ( $37^\circ\text{C}$ ; 5%  $\text{CO}_2$ , ar úmido) por 10 min (colunas azuis) ou 90 min (colunas vermelhas) com BAY 41-2272 em concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  ou DMSO (0,7%). As células controle são representadas por PBS. Cada experimento foi realizado em triplicata ( $n=3$ ). Os níveis de GMPc são expressos em pmol/mL em  $1,5 \times 10^6$  eosinófilos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $P<0,01$  e \*\* $P<0,001$  comparado ao respectivo PBS, # $P<0,001$  comparado ao respectivo protocolo de 10 min de incubação.

### 3.3. EFEITO DO ODQ SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE GMPc INDUZIDOS POR BAY 41-2272

A incubação prévia (10 min; 37°C; 5% CO<sub>2</sub>; ar úmido) dos eosinófilos com ODQ (0,2 mM) foi capaz de abolir o aumento dos níveis intracelulares de GMPc produzidos pelo BAY 41-2272 nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µM, no protocolo de 90 min (Figura 3).

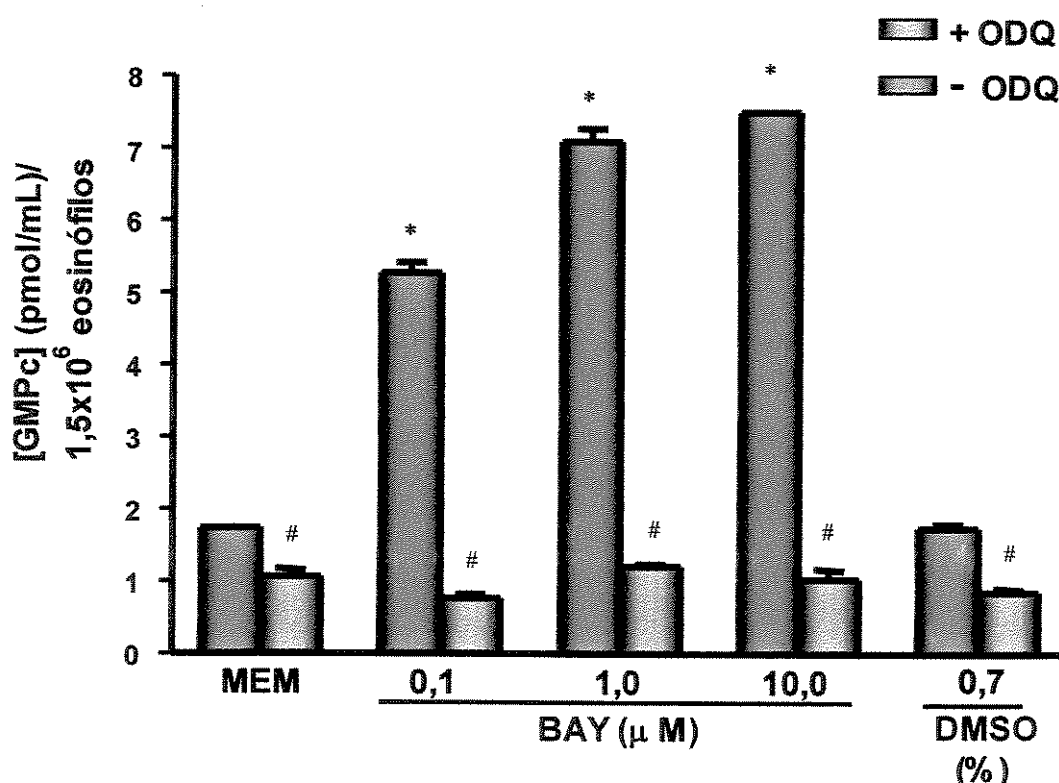
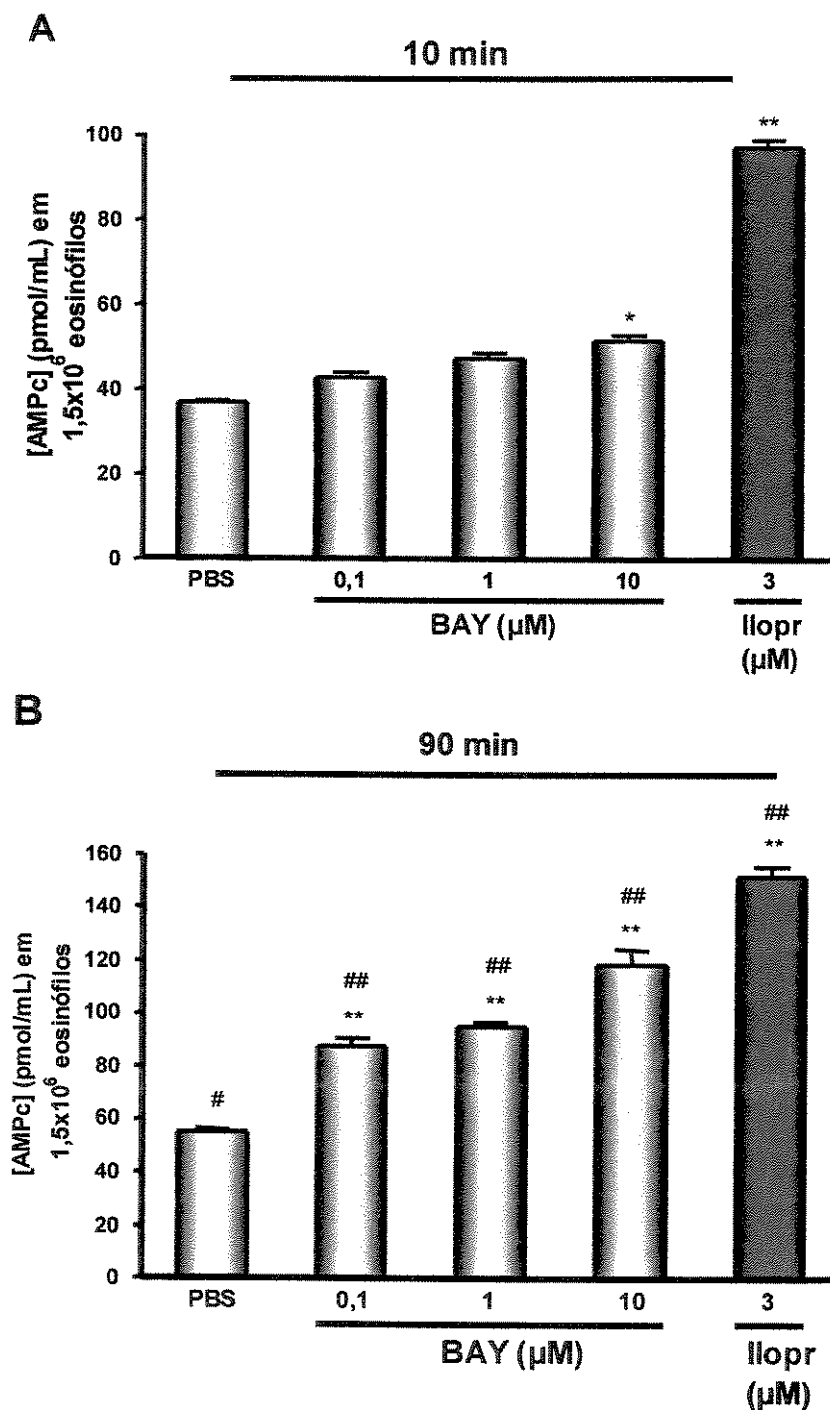


Figura 3 – Efeito do ODQ sobre o aumento dos níveis intracelulares de GMPc em eosinófilos incubados por 90 min com BAY 41-2272. A suspensão de eosinófilos humanos (1,5x10<sup>6</sup> células/poço) foi incubada (37°C) por 90 min com BAY 41-2272 (0,1, 1,0 e 10 µM) ou DMSO (0,7%) na ausência (colunas douradas) ou na presença (colunas azuis) de ODQ (0,2 mM). Cada experimento foi realizado em triplicata (n=3). Os níveis de GMPc são expressos em pmol/mL em 1,5 x 10<sup>6</sup> eosinófilos. Os resultados são apresentados como média ± EPM. \*P<0.001 comparado ao respectivo controle (PBS), #P<0.001 comparado as amostras na ausência de ODQ.

### **3.4. EFEITO DO BAY 41-2272 SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE AMPc**

A incubação dos eosinófilos com BAY 41-2272 ( $n=3$ ) por 10 min ( $10,0\ \mu\text{M}$ ) ou por 90 min ( $0,1$ ,  $1,0$  e  $10,0\ \mu\text{M}$ ), aumentou significativamente os níveis de AMPc intracelular. No entanto, o protocolo de 90 min resultou em um aumento bem maior comparado com o protocolo de 10 min (105%, 100% e 131% maiores para  $0,1$ ,  $1,0$  e  $10,0\ \mu\text{M}$ , respectivamente). O veículo DMSO ( $0,7\%$ ) não afetou os níveis intracelulares de GMPc comparado as células não tratadas. O ativador da adenilato ciclase solúvel iloprost ( $3\ \text{M}$ ), usado como controle positivo, de forma marcante aumentou os níveis de AMPc em ambos os protocolos usados ( $P>0,001$ ), mas o aumento produzido no protocolo de 90 min foi 56% maior que o produzido no protocolo de 10 min (Figura 4).



**Figura 4 – Efeito do BAY 41-2272 sobre os níveis intracelulares de AMPc em eosinófilos após 10 ou 90 min de incubação.** A suspensão de eosinófilos humanos ( $1,5 \times 10^6$  cél./poço) foi incubada ( $37^\circ\text{C}$ ; 5%  $\text{CO}_2$ ; ar úmido) por 10 (painel A) ou 90 min (painel B) com BAY 41-2272 em concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  ou com 3  $\mu\text{M}$  de lloprost. As células controle são representadas por PBS. Cada experimento foi realizado em triplicata ( $n=3$ ). Os níveis de AMPc são expressos em pmol/ml em  $1,5 \times 10^6$  eosinófilos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $P<0,01$  e \*\* $P<0,001$  comparado ao respectivo PBS, # $P<0,01$  e ## $P<0,001$  comparado ao respectivo protocolo de 10 min de incubação.

### 3.5. ENSAIO DE ATIVIDADE CELULAR PELO MTT

Os ensaios de redução de MTT mostraram que tanto em um tempo curto de incubação (10 min) como em tempo prolongado (90 min), o BAY 41-2272, nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ , não causou qualquer efeito tóxico sobre os eosinófilos. O DMSO (0,7%) em ambos os tempos de incubação também não provocou citotoxicidade (Figura 5).

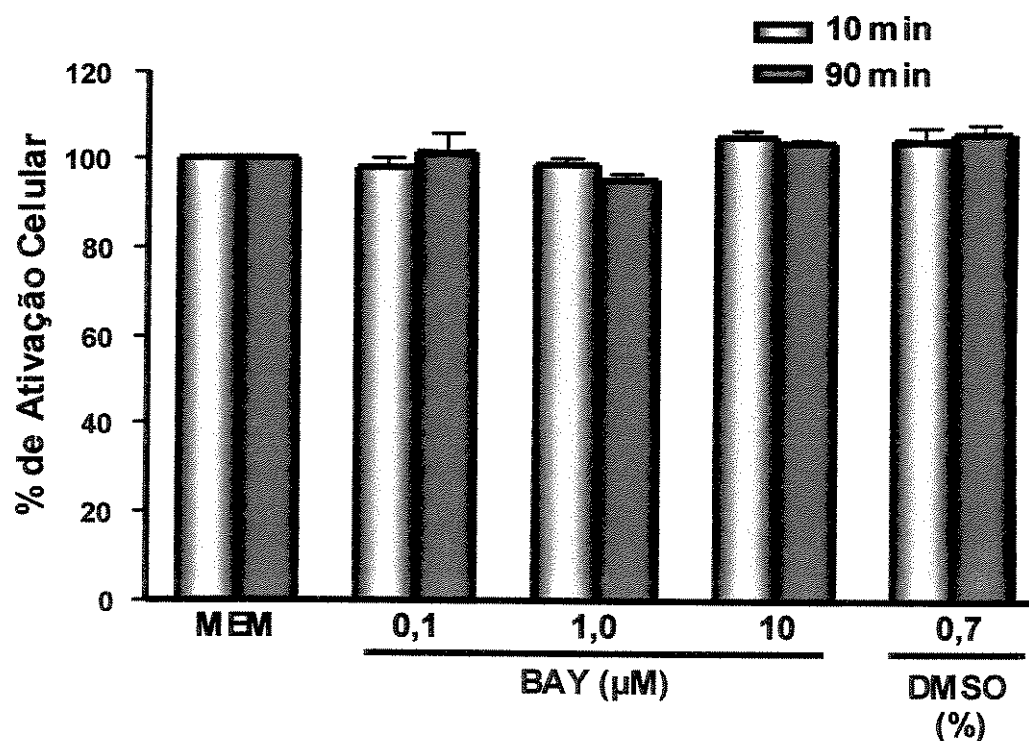


Figura 5 – Efeito do BAY 42-2272 sobre a ativação celular, realizada pelo MTT. Os eosinófilos ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram incubados com BAY 41-2272 (0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ ), ou com DMSO (0,7%) por 10 ou 90 min. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=3$ ).



## *4. DISCUSSÃO*

Neste trabalho, nos preocupamos em investigar os efeitos do BAY 41-2272 sobre a quimiotaxia de eosinófilos *in vitro*. Este composto estimula diretamente a GCs e eleva as concentrações intracelulares de GMPc por mecanismo independente de NO (STASCH et al., 2001; STRAUB et al., 2001).

Os nucleotídeos cíclicos são conhecidos por modular os processos de ativação de leucócitos, mas o papel destes segundos-mensageiros, principalmente do GMPc, na locomoção celular é ainda bastante controverso.

Estudos prévios mostraram a existência de uma via funcional NO/GMPc que modula a quimiotaxia de eosinófilos humanos, onde o bloqueio desta via, pelo uso de L-NAME (inibidor não seletivo da NOS) ou de ODQ (inibidor seletivo da GCs), resulta em inibição da quimiotaxia de eosinófilos induzida por fMLP ou eotaxina, sendo esta inibição revertida pela adição exógena de doadores de NO (SNP, SNAP e SIN-1) ou do análogo permeável do GMPc (dibutiril-GMPc) (THOMAZZI et al., 2001; FERREIRA et al., 2002). Resultados semelhantes já haviam sido observados em eosinófilos de rato, assim como em neutrófilos e células mononucleares humanas (KAPLAN et al., 1989; BELENKY et al., 1993 a,b; ZANARDO et al., 1997). Diversos trabalhos apontam para um papel pró-inflamatório do NO, onde a supressão ou a queda dos níveis intracelulares de GMPc reduziriam a locomoção celular, inibindo, conseqüentemente, a resposta inflamatória tecidual dependente de eosinófilos, por exemplo a asma brônquica (TEIXEIRA et al., 1993; FERREIRA et al., 1996,1998; FEDER et al., 1997).

Contudo, um estudo recente demonstrou que o aumento dos níveis de GMPc causados pela adição exógena de NO, na forma de doadores de NO como SNP, SIN-1 e SNAP, inibe a quimiotaxia de eosinófilos humanos induzida por

fMLP de forma concentração-dependente e não citotóxica (THOMAZZI et al., 2004). Inibição da quimiotaxia de monócitos humanos e de PMN humanos por NO autêntico ou doadores de NO derivados do oxatriazol (GEA 3162 e GEA 5024) já havia sido publicada (BATH et al., 1991; MOILANEN et al., 1993; WANIKIAT et al., 1997), corroborando com os resultados de THOMAZZI et al. (2004). Estes estudos apontaram para um papel antiinflamatório do NO-GMPc em eosinófilos. Desta forma, ações antiinflamatórias e pró-inflamatórias do NO-GMPc têm sido vastamente apresentadas na literatura, tanto em modelos *in vivo* como *in vitro*, não se chegando ainda a um consenso sobre o verdadeiro papel do NO na locomoção celular.

A literatura sugere que as ações benéficas (fisiológicas) do NO são mediadas predominantemente via ativação da GCs, ou seja, dependentes de GMPc, e as ações destrutivas (patológicas) do NO são devido a sua capacidade de modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que ocorre independente de GMPc (HOBBS, 2002).

Como já mencionamos, o BAY 41-2272 é um composto capaz de ativar a GCs e conseqüentemente aumentar a produção de GMPc, através de sua ligação a um sítio diferente e independente do NO. Dessa forma, o BAY 41-2272 tem se mostrado uma nova ferramenta farmacológica nesse campo de pesquisa, nos impulsionando a estudar os seus efeitos na quimiotaxia de eosinófilos humano com a possibilidade de comparar os resultados com os clássicos doadores de NO.

Assim, decidimos adotar os mesmos protocolos experimentais de incubação utilizados com os doadores de NO (THOMAZZI et al., 2004), ou seja,

10 e 90 minutos de exposição dos eosinófilos ao BAY 41-2272, para explorar uma possível resposta bifásica do GMPc.

Observamos, inicialmente, que os eosinófilos não tratados exibiram uma resposta quimiotóxica substancialmente maior ao fMLP (aproximadamente 1,6 vezes) no protocolo de 90 min de exposição, em comparação às células não tratadas no protocolo de 10 min. Em ambos os protocolos funcionais, a única diferença é que nos experimentos de 10 min de exposição, as células foram lavadas antes de serem submetidas ao ensaio de quimiotaxia, enquanto que nos experimentos de 90 min este procedimento de lavagem não foi realizado. As implicações deste achado não estão completamente esclarecidas, mas podemos sugerir que ao lavarmos as células no protocolo de 10 min de exposição, retiramos possíveis mediadores liberados pelos eosinófilos devido ao manuseio destas células no decorrer do experimento, bem como durante o tempo de incubação (30 min, 37°C) antes de serem submetidas ao ensaio de quimiotaxia, os quais poderiam contribuir para uma resposta quimiotóxica maior. Outra hipótese que podemos sugerir é que, ao lavarmos as células no protocolo de 10 min, teríamos perdido uma pequena quantidade de células e isso levaria a uma menor amplitude na quimiotaxia. No entanto, esta hipótese é enfraquecida pelos resultados de dosagem de GMPc, onde os níveis basais deste nucleotídeo cíclico são os mesmos em ambos os protocolos utilizados.

Nossos resultados mostraram que o BAY 41-2272, nas concentrações de 10,0, 1,0 e 0,1  $\mu\text{M}$  no protocolo de 90 min e 1,0  $\mu\text{M}$  no protocolo de 10 min, exibiu um marcante efeito inibitório sobre a quimiotaxia dos eosinófilos estimulados com fMLP. Ao mesmo tempo, verificamos que a exposição dos eosinófilos ao BAY 41-

2272, aumentou os níveis intracelulares de GMPc de forma significativa, tanto no protocolo de 10 min como no de 90 minutos de exposição. Entretanto, o perfil de inibição da quimiotaxia com 1,0  $\mu$ M de BAY 41-2272 foi praticamente o mesmo em ambos os protocolos, ou seja, cerca de 50% de inibição. Isto mostra que o efeito inibitório parece não estar diretamente relacionado ao aumento dos níveis de GMPc provenientes da exposição prolongada, que são aproximadamente 2 vezes maiores comparado com os experimentos de curta exposição.

O ODQ é um composto capaz de inibir a atividade da GCs estimulada pelo NO (GARTHWAITE et al., 1995) e tem sido amplamente utilizado para estudar a função da via de transdução NO-GMPc. Doadores de NO, tais como o gliceril trinitrato, exercem seus efeitos através de um mediador comum, o NO (FEELISCH, 1998), que se liga ao sítio heme da GCs, ativando a enzima e catalisando a conversão do GTP a GMPc (LUCAS et al., 2000). O efeito inibitório do ODQ sobre a GCs estimulada pelo NO é devido a mudanças no estado de oxidação do grupamento heme, sem exercer efeitos adversos sobre o domínio catalítico da enzima (ZHAO et al., 2000). Dessa forma, em enzima purificada, o ODQ não altera o efeito do BAY 41-2272 sobre a estimulação da GCs (STASCH et al., 2001). Além disso, em corpo cavernoso de coelho e humano, o relaxamento provocado pelo BAY 41-2272 é somente parcialmente inibido pelo ODQ (BARACAT et al., 2003). No entanto, em nosso trabalho, o aumento dos níveis de GMPc provocados pelo BAY 41-2272 em eosinófilos humano foi completamente prevenido pela pré-incubação com o ODQ. Recentemente foi demonstrado que o ODQ, além de oxidar o grupamento heme da GCs, é também capaz de exercer um mecanismo alostérico, modificando a estrutura secundária da enzima

recombinante (KOSARIKOV et al., 2001). Assim, sugerimos que o ODQ, em eosinófilos, é capaz de interferir com a ligação do BAY 41-2272 à GCs através deste mecanismo alostérico, diminuindo a ativação da enzima.

O BAY 41-2272 é uma pirazolopiridina que estimula a GCs de forma independente de NO e que, em teoria, não gera espécies reativas de óxido de nitrogênio, como fazem alguns doadores de NO, como o SIN-1 (BECKMAN et al., 1994; AMIRMANSOUR et al., 1999). Isto diminui a hipótese que o BAY 41-2272 exerça seus efeitos inibitórios na quimiotaxia através de nitração de proteínas. É importante mencionar, no entanto que, estudos recentes demonstraram que além de estimular a produção de GMPc de maneira independente de NO, o BAY 41-2272 (ou seu composto precursor YC-1) é capaz de liberar NO endógeno de células endoteliais *in vitro* (WOHLFART et al., 1999) e de corpo cavernoso (KALSI et al., 2003; BARACAT et al., 2003; BISCHOFF et al., 2003). De qualquer forma, é muito improvável que os mecanismos que determinam a redução da quimiotaxia de eosinófilos pela exposição ao BAY 41-2272 ocorram em consequência de nitração de proteínas, visto que os doadores de NO produzem uma resposta inibitória funcional, acompanhada de elevação dos níveis de GMPc, sem promover nitração de tirosina, utilizando protocolos idênticos aos deste estudo (THOMAZZI et al., 2004).

Estudos anteriores reportaram que longo tempo de geração de NO pode levar à apoptose celular (BEAUVAIS e JOLY, 1999; WARD et al., 2000; MOULIAN et al., 2001). Embora o NO, *per se*, não seja um agente citotóxico, pode tornar as células susceptíveis a outros agentes citotóxicos, tais como metais pesados, agentes alquilantes e radiação (WINK e MITCHELL, 1998). No entanto, o ensaio

de MTT não revelou toxicidade celular em quaisquer concentrações de BAY 41-2272 utilizadas, descartando a possibilidade de que a diminuição da quimiotaxia de eosinófilos, com a exposição prolongada ao BAY 41-2272, reflita morte celular.

Em publicação recente, HWANG et al. (2003) estudaram as ações do YC-1, o composto precursor do BAY-412272, sobre algumas funções de neutrófilos humano. Foi observado que o YC-1 é capaz de inibir a liberação de ânion superóxido e desgranulação de neutrófilos induzidos por fMLP, sendo esta inibição dependente de aumento dos níveis intracelulares de AMPc e ativação da PKA.

Em virtude disso, decidimos investigar se o BAY 41-2272 é capaz de elevar os níveis de AMPc em eosinófilos humano.

É bem estabelecido que a elevação dos níveis intracelulares de AMPc, seja pela ativação da adenilato ciclase ou por inibição das PDEs, suprime várias atividades dos eosinófilos, inclusive a quimiotaxia (EZEAMUZIE et al., 2001; ITOH et al., 1993; TENOR et al., 1996; ALVES et al., 1996; LAGENTE et al., 1994, 1995). Em nosso estudo, o BAY 41-2272 aumentou significativamente os níveis intracelulares de AMPc nos eosinófilos em ambas as condições utilizadas (10 e 90 min de exposição). Desta forma seria possível cogitar que o AMPc, mais que o GMPc, tenha um papel importante no efeito inibitório do BAY 41-2272 sobre a quimiotaxia de eosinófilos. Entretanto, esta sugestão é enfraquecida por nossos achados, que mostram que 1  $\mu$ M de BAY 41-2272 produz o mesmo nível de inibição da quimiotaxia (aproximadamente 50%) em condições de níveis baixos (ensaio de 10 min) ou elevados (ensaio de 90 min) de AMPc. No entanto, não podemos negligenciar a possibilidade que pequenas concentrações de AMPc e

GMPc alcançadas com a curta exposição ao BAY 41-2272 (1  $\mu$ M) já tenham sido suficientes para produzir inibição máxima da quimiotaxia de eosinófilos induzida por fMLP. Assim, o AMPc e GMPc produzidos nas células incubadas com BAY 41-2271, podem estar agindo sinergicamente nos eosinófilos levando à inibição máxima na migração celular. Um estudo prévio mostrou que baixas concentrações de AMPc e GMPc exercem uma ação inibitória sinérgica sobre a agregação de plaquetas de coelhos *in vitro* (LIDBURY et al., 1989).

Uma outra hipótese que poderia ser especulada para explicar nossos resultados é a dessensibilização da resposta celular ao GMPc, um fenômeno demonstrado recentemente em plaquetas (MULLERSHAUSEN et al., 2001; 2003). No geral, estes trabalhos mostram que a pré-incubação de plaquetas humanas com doses baixas de doador de NO (DEA-NO), por 3 minutos, e posterior incubação com dose máxima (10  $\mu$ M) deste mesmo doador rapidamente leva a redução na resposta do GMPc, devido ao aumento da fosforilação e atividade da PDE<sub>5</sub> que degrada o GMPc. Este efeito é abolido na presença do ODQ, inibidor da GCs. No entanto, em nosso estudo, independente do tempo de exposição ao BAY 41-2272, curto (10 min) ou longo (90 min), os níveis de GMPc nos eosinófilos estão aumentados, sugerindo que não há dessensibilização na resposta do GMPc nestas células.

Em eosinófilos humanos, o SNAP, doador de NO, por via dependente de GMPc, é capaz de induzir o efluxo de íons K<sup>+</sup>, levando à hiperpolarização celular diminuindo a concentração de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático. Isto torna os eosinófilos menos estimulados, os quais requerem um forte estímulo para se despolarizarem



(SCHWINGSHACKL et al., 2002). Dessa forma, é possível especular que este mecanismo também ocorra com o BAY 41-2272 nos eosinófilos; entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer este fenômeno.

Em trabalho publicado recentemente foi observado que o doador de NO (DEA-NO) e o BAY 41-2272 (1  $\mu$ M) foram capazes de diminuir significativamente o rolamento e adesão de leucócitos em camundongos *knockout* para eNOS e em camundongos controle estimulados com IL-1 $\beta$  (AHLUWALIA, et al., 2004). Estes achados são condizentes com nossos resultados *in vitro*.

Em conclusão, nosso estudo mostra que a exposição ao BAY 41-2272 produz um efeito inibitório, não citotóxico, na quimiotaxia de eosinófilos humano, que não depende do tempo de exposição, mas é acompanhado de elevações adicionais nos níveis de GMPc e AMPc.

Dentre os novos compostos ativadores da GCs, o BAY 41-2272 parece ser útil como uma ferramenta farmacológica importante para se estudar a GCs, oferecendo também grande potencial terapêutico nas desordens inflamatórias.

## **5. CONCLUSÕES**

### **5.1. SUMÁRIO E CONCLUSÃO**

- A quimiotaxia de eosinófilos induzida por fMLP foi significativamente diminuída pelo BAY 41-2272 em ambos os tempos de incubação (10 e 90 min);
- O BAY 41-2272 aumentou os níveis de GMPc em eosinófilos humanos em ambos os tempos de incubação, com níveis mais elevados (aproximadamente 2 vezes) no protocolo de 90 min;
- O BAY 41-2272 aumentou de forma significativa os níveis de AMPc em eosinófilos em ambos os protocolos, com níveis maiores no protocolo de 90 min;
- O BAY 41-2272 é desprovido de efeito citotóxico nos eosinófilos.
- A inibição da quimiotaxia de eosinófilos pelo BAY 41-2272 não está diretamente relacionada à elevação adicional dos níveis de GMPc e de AMPc.

## ***6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- AHLUWALIA, A.; FOSTER, P.; SCOTLAND, R. S.; MCLEAN, P. G.; MATHUR, A.; PERRETTI, M.; MONCAD, S.; HOBBS, A. Antinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **101** (5): 1386-1391, 2004.
- ALVES, A.C.; PIRES, A.L.; CRUZ, H.N.; SERRA, M.F.; DIAZ, B.L.; CORDEIRO, R.S.; LAGENTE, V.; MARTINS, M.A. Selective inhibition of phosphodiesterase type IV suppresses the chemotactic responsiveness of rat eosinophils in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, **312**: 89-96, 1996.
- AMIRMANSOUR, C.; VALLANCE, P. & BOGLE, R.G. Tyrosine nitration in blood vessels occurs with increasing nitric oxide concentration. **Br. J. Pharmacol.**, **127**: 788-794, 1999.
- BARACAT, J.S.; TEIXEIRA, C.E.; OKUYAMA, C.E.; PRIVIERO, F.B.; FARO, R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Relaxing effects induced by the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. **Eur. J. of Pharmacol.**, **477**: 163-169, 2003.
- BARNES, P.J. Pathophysiology of asthma. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **42**: 3-10, 1996.
- BATH, P.M.W.; HASSALL, D.G.; GLADWIN, A.M.; PALMER, R.M.J.; MARTIN, J.F. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. **Arterioscler. Thromb.**, **11**: 254-260, 1991.
- BEAUVAIS, F.; JOLY, F. Effects of nitric oxide on the eosinophil survival in vitro. A role for nitrosyl-heme. **FEBS Lett.**, **443**(1): 37-40, 1999 Jan.
- BECKER, E.M.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; GERZER, R.; MINUTH, T.; PLEIß, U.; SCHMIDT, P.; SCHRAMM, M.; SCHRÖDER, H.; SCHROEDER, W.; STEINKE, W.; STRAUB, A. & STASCH, J-P. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. **BCM Pharmacology**, **1**: 13-24, 2001.
- BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, **271**: C1424-C1437, 1996.
- BECKMAN, J.S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chem. Res. Toxicol.**, **9**: 836-844, 1996.
- BECKMAN, J.S.; YE, Y.Z.; ANDERSON, P.G.; CHEN, J.; ACCAVITTI, M.A.; TARPEY, M.M. & WHITE, C.R. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. **Biol. Chem. Hoppe Seyler.**, **375**: 81-88, 1994.

- BELENKY, S.N.; ROBBINS, R.A. & RUBINSTEIN, I. Nitric oxide inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. **J. Leukoc. Biol.**, **53**: 498-503, 1993b.
- BELENKY, S.N.; ROBBINS, R.A.; RENNARD, S.I.; GOSSMAN, G.L.; NELSON, K.J. & RUBINSTEIN, I. Inhibition of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. **J. Lab. Clin. Med.**, **122**: 388-394, 1993a.
- BIEL, M.; ZONG, X.; LUDWIG, A.; SAUTTER, A.; HOFMANN, F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, **135**: 151-171, 1999.
- BIRREL, M.; MCCLUSKIE, K.; HADDAD, E.; BATTRAM, C.H.; WEBBER, S.E.; FOSTER, M.L.; YACIOUB, M.H.; BELVISI, M.G. Pharmacological assessment of the nitric oxide synthase isoform involved in eosinophilic inflammation in a rat model sephadex induced airway inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **304**: 1285-1291, 2003.
- BISCHOFF, M.; SCHRAMM, M.; STRAUB, A.; FEURER, A.; STASCH, J.P. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylate cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection *in vivo*. **Urology**, **61** (2): 464-467, 2003.
- BLOM, M.; TOOL, A.T.J.; ROOS, D. & VERHOEVEN, A.J. Priming of human eosinophils by platelet-activating factor enhances the number of cells able to bind and respond to opsonized particles. **J. Immunol.**, **149**: 3672-3677, 1992.
- BOERRIGTER, G.; COSTELLO-BOERRIGTER, L.C.; CATALIOTTI, A.; TSURUDA, T.; HARTY, G.J.; LAPP, H.; STASCH, J.P.; BURNETT, J.C. Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. **Circulation**, **107**: 686-9, 2003.
- BRAUGHLER, J.M.; MITTAL, C.K.; MURID, F. Purification of soluble guanylate cyclase from rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**: 219-222, 1979.
- BRAUN, R.K.; FRANCHINI, M.; ERARD, F.; RIHS, S.; DE VRIES, I.J.M.; BLASER, K.; HANSEL, T.T. & WALKER, C. Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. **Eur. J. Immunol.**, **23**: 956-960, 1993.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **86**: 9030-9033, 1991.
- BRIONI, J.D.; NAKANE, M.; HSIEH, G.C.; MORELAND, R.B.; KOLASA, T.; SULLIVAN, J.P. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. **Int. J. Impot. Res.**, **14**: 8-14, 2002.

- BROIDE, D.H.; HOFFMAN, H. & SRIRAMARAO, P. Insights from model systems – Genes that regulate eosinophilic inflammation. **Am. J. Hum. Genet.**, **65**: 302-307, 1999.
- BROIDE, D.H.; PAINE, M.M. & FIRESTEIN, G.S. Eosinophils express interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. **J. Clin. Invest.**, **90**: 1414-1442, 1992.
- BUECHLER, W.A., NAKANE, M., MURAD, F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **174**:351-7, 1991.
- BURKE, L.A.; CREA, A.E.G.; WILKINSON, J.R.W.; ARM, J.P.; SPUR, B.W. & LEE, T.H. Comparison of the generation of platelet-activating factor and leukotriene C<sub>4</sub> in human eosinophils stimulated by unopsonized zymosan and by calcium ionophore A23187: The effects of nedocromil sodium. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **85**: 26-35, 1990.
- BUSSE, W.W. & SEDGWICK, J.B. Eosinophils in asthma. **Ann. Allergy**, **68**: 286-290, 1992.
- BUTCHERS, P.R. & VARDEY, C.J. The effect of prostanoids on the function of human eosinophils. **Agents Actions Suppl.**, **31**: 103-112, 1990.
- BUTTERFIELD, J.H.; LEIFERMAN, K.M. & GLEICH, G.J. Eosinophil-associated diseases, in Frank M.M., Austen K.F., Claman H.N., Unanue, E.R. (eds): **Samter's Immunologic Diseases**. Boston, MA, Little Brown and Co, p. 501, 1995.
- CELEK, S. The Rho-kinase inhibitor Y-27632 and the soluble guanylate cyclase activator BAY 41-2272 relax rabbit vaginal wall and clitoral corpus cavernosum. **Br. J. Pharmacol.**, **138**: 287-290, 2003.
- CLUTTERBUCK, E.J.; HIRST, E.M.A. & SANDERSON, C.J. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. **Blood**, **73**: 1504-1512, 1989.
- COËFFIER, E.; JOSEPH, D. & VARGAFTIG, B.B. Activation of guinea-pig eosinophils by human recombinant IL-5. Selective priming to platelet-activating factor and interference with its antagonists. **J. Immunol.**, **147**: 2595-2602, 1991.
- COËFFIER, E.; JOSEPH, D. & VARGAFTIG, B.B. Role of interleukin-5 in enhanced migration of eosinophils from airways of immunized guinea-pigs. **Br. J. Pharmacol.**, **113**: 749-756, 1994.

- COLLINS, P.D.; WEG, V.B.; FACCIOLI, L.H.; WATSON, M.L.; MOQBEL, R. & WILLIAMS, T.J. Eosinophil accumulation by human interleukin-8 in the guinea-pig *in vivo*. **Immunology**, **79**: 312-318, 1993.
- CONNELLY, L.; JACOBS, A.T.; PALACIOS-CALLENDER, M.; MONCADA, S.; HOBBS, A.J. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. **J. Biol. Chem.**, **278**(29): 26480-7, 2003.
- CONRAN, N.; FERREIRA, H.H.; LORAND-METZE, I.; THOMAZZI, S.M.; 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.**, **134**: 632-8, 2001.
- COSTA, J.J.; MATOSSIAN, K.; BEIL, W.J.; WONG, D.T.W.; GORDON, J.R.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. & GALLI, S.J. Human eosinophils can express the cytokines TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$ . **J. Clin. Invest.**, **91**: 2673-2684, 1993.
- DESREUMAUZ, P.; JANIN, A.; COLOMBEL, J.F.; PRIN, L.; PLUMAS, J.; EMILIEE, D.; TORPIER, G.; CAPRON, A. & CAPRON, M. Interleukin-5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. **J. Exp. Med.**, **175**: 293-296, 1992.
- DEVREOTES, P.N. & ZIGMOND, S.H. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. **Ann. Rev. Cell. Biol.**, **4**: 649-686, 1988.
- DOWNEY, G.P. Mechanisms of leukocyte motility and chemotaxis. **Curr. Opin. Immunol.**, **6**: 113-124, 1994.
- DUBOIS, G.R.; BRUIJNZEEL KOOMEN, C.A. & BRUIJNZEEL, P.L. IL-4 induces chemotaxis of blood eosinophils from atopic dermatitis patients, but not from normal individuals. **J. Invest. Dermatol.**, **102**: 843-846, 1994.
- ELFERINK, J.G.R. & VANUFFELEN, B.E. The role of cyclic nucleotides in neutrophil migration. **Gen. Pharmacol.**, **27**: 387-393, 1996.
- ESTENSEN, R.D.; HILL, H.R.; QUIE, P.G.; GOGAN, N.; GOLBERG, N.D. Cyclic GMP and cell movement. **Nature**, **245** (5426): 458-460, 1973.
- EZEAMUZIE, C.I. Requirement of additional adenylate cyclase activation for the inhibition of human eosinophil degranulation by phosphodiesterase IV inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, **417**: 11-8, 2001.
- FACCIOLI, L.H.; NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F.M.; SEHMI, R.; KAY, A.B. & WILLIAMS, T.J. The accumulation of  $^{111}\text{In}$ -eosinophils induced by inflammatory mediators *in vivo*. **Immunology**, **73**: 222-227, 1991.



- FEDER, L.S.; STELTS, D.; CHAPMAN, R.W.; MANFRA, D.; CRAWLEY, Y.; JONES, H.; MINNICOZZI, M.; FERNANDEZ, X.; PASTER, T.; EGAN, R.W.; KREUTNER, W. & KUNG, T.T. Role of nitric oxide on eosinophilic lung inflammation in allergic mice. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, **17**: 436-442, 1997.
- FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **358**(1): 113-22, 1998.
- FERREIRA, H.H.A.; LODO, M.L.S.; MARTINS, A.R.; KANDRATAVICIUS, L.; SALAROLI, A.F.; CONRAN, N.; ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. Expression of nitric oxide synthases and in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. **Eur. J. Pharmacol.**, **442**(1-2): 155-62, 2002.
- FERREIRA, H.H.A.; BEVILACQUA, E.; GAGIOTI, S.M.; ZANARDO, R.C.O.; TEIXEIRA, C.E.; SANNOMIYA, P.; ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **358**: 253-259, 1998.
- FERREIRA, H.H.A.; MEDEIROS, M.V.; LIMA, C.S.P.; FLORES, C.A.; SANNOMIYA, P.; ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. **Eur. J. Pharmacol.** **310**: 201-207, 1996.
- FERRERO, R., TORRES, M. Prolonged exposure to YC-1 induces apoptosis in adrenomedullary endothelial and chromaffin cells through a cGMP-independent mechanism. **Neuropharmacology**, **41**: 895-906, 2001.
- FORSSMAN, U.; UGUCCIONI, M.; LOETSCHER, P.; DAHINDEN, C.A.; LANGEN, H.; THELEN, M. & BAGGIOLINI, M. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. **J. Exp. Med.**, **185**: 2171-2176, 1997.
- FRANCIS, S.H.; TURKO, I.V.; CORBIN, J.D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, **65**: 1-52.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373-376, 1980.
- GALE, L.M. & MCCOLL, S.R. Chemokines: extracellular messengers for all occasions? **BioEssays**, **21**: 17-28, 1999.

- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K. & MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, **48**: 184-188, 1995.
- GERZER, R., RADANY, E.W., GARBERS, D.L. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **108**: 678-86, 1982.
- GIEMBYCZ, M.A. & LINDSAY, M.A. Pharmacology of the eosinophil. **Pharmacol. Rev.**, **51**: 213-339, 1999.
- GIEMBYCZ, M.A.; KROEGEL, C. & BARNES, P.J. Stimulation of the cyclooxygenase pathway in eosinophils by platelet-activating factor. Release of thromboxane-A<sub>2</sub> and prostaglandine E and their effects on eosinophil function. **J. Immunol.**, **144**: 3489-3497, 1990.
- GLEICH, G.J.; ADOLPHSON, C.R. & LEIFERMAN, K.M. Eosinophils. In: **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, Second Edition, ed. By J.I. Gallin, I.M. Goldstein and R. Snyderman pp. 663-700, Raven Press, New York, 1992.
- GLEICH, G.J.; KITA, H. & ADOLPHSON, C.R. Eosinophils, in Frank M.M., Austen K.F., Claman H.N., Unanue E.R. (eds): **Samter's Immunologic Diseases**. Boston, M.A., Little Brown and Co, p. 205, 1995.
- GOETZL, E.J.; WASSERMAN, S.I.; GIGLI, I.; AUSTEN, K.F. Enhancement of random migration and chemotactic response of human leucocytes by ascorbic acid. **J. Clin. Invest.**, **53** (3): 813-818, 1974.
- GROVES, J.T. & WANG, C.C-Y. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. **Curr. Op. Chem. Biol.**, **4**: 687-695, 2000.
- HAKANSSON, L.; WESTERLUND, D. & VENGE, P. New methods for the measurement of eosinophil migration. **J. Leuk. Biol.**, **42**: 689-696, 1987.
- HAMID, Q.; BARKANS, J.; MENG, Q.; YING, S.; ABRAMS, J.S.; KAY, A.B. & MOQBEL, R. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6 *in vitro*. **Blood**, **80**: 1496-1501, 1992.
- HANSEL, T.T.; DE VRIES, I.J.M.; 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**, **145**: 105-110, 1991.

- HANSEL, T.T.; POUND, J.D.; PILLING, D.; KITAS, G.D.; SALMON, M.; GENTLE, T.A.; LEE, S.S. & THOMPSON, R.A. Purification of human blood eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads. **J. Immunol. Methods**, **122**: 97-103, 1989.
- HARTENECK, C.; KOESLING, D.; SÖLING, A.; SCHULTZ, G. BÖHME, E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. **FEBS Lett.**, **272**: 221-223, 1990.
- HEVEL, J.M.; WHITE, K.A. & MARLETTA, M.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. **J. Biol. Chem.**, **266**: 22789-22791, 1991.
- HOBBS, A.J. Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. **Br. J. Pharmacol.**, **136**: 637-40, 2002.
- HOBBS, A.J.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. **Methods Enzymol.**, **269**: 134-148, 1996.
- HOLGATE, S.T.; BODEY, K.S.; JANEZIC, A.; FREW, A.J.; KAPLAN, A.P. & TERAN, L.M. Release of RANTES, MIP-1 alpha and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **156**: 1377-1383, 1997.
- HORIE, S.; OKUDA, Y.; HOSSAIN, M.; SATO, E.; NOMURA, H.; KOYAMA, S.; SUZUKI, J.; ISOBE, M. & SEKIGUCHI, M. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. **Intern. Med.**, **36**: 179-185, 1997.
- HOWARD, T.; CHAPONNIER, C.; YIN, H. & STOSSEL, T.P. Gelsolin-action interaction and action polymerization in human neutrophils. **J. Cell. Biol.**, **110**: 1983-1991, 1990.
- HUMBERT, M.; YING, S.; CORRIGAN, C.; MENZ, G.; BARKANS, J. & PFISTER, R. Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and non-atopic asthmatics: relationship to the eosinophil active cytokines interleukin (IL)-5, granulocyte macrophage colony stimulating factor and IL-3. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, **16**: 1-8, 1997.
- HWANG, T.; HUNG, H.; KAO, S.; TENG, C.; WU, C. Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 inhibits human neutrophil functions through a cGMP-independent but cAMP-dependent pathway. **Mol. Pharmacol.**, **64**: 1419-1427, 2003.

- IGNARRO, L.J., DEGNAN, J.N., BARICOS, W.H., KADOWITZ, P.J., WOLIN, M.S. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. **Biochim. Biophys. Acta.**, **718**: 49-59, 1982.
- IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.; BUGA, G.M.; WOOD, R.S.; CHAUDHURI, G. Pharmacological evidence that endothelium derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superóxide dismutase to study the endothelium dependent and nitric oxide elicited vascular smooth muscle relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **244**: 181-189, 1987.
- IJIMA, H., DUGUET, A., EUM, S.Y., HAMID, Q., EIDELMAN, D.H. Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **163**: 1233-40, 2001.
- IOZZO, R.V.; MACDONALD, G.H. & WIGHT, T.N. Immunoelectron microscopic localization of catalase in human eosinophil leukocytes. **J. Histochem. Cytochem.**, **30**: 697-701, 1982.
- ISCHIROPOULOS, H., ZHU, L., CHEN, J., TSAI, M., MARTIN, J.C., SMITH, C.D., BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Arch. Biochem. Biophys.**, **298**: 431-7, 1992.
- ITOH, K.; MUKAIYAMA, O.; SATOH, Y.; YAMAGUCHI, T.; IIZUKA, Y. Effects of CS-518, a thromboxane synthase inhibitor, on eosinophil function. **Eur. J. Pharmacol.**, **239**: 159-69, 1993.
- JACOBY, D.B.; GLEICH, G.J. & FRYER, A.D. Human eosinophil major basic proteins is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. **J. Clin. Invest.**, **91**: 1314-1318, 1993.
- JULIFS, D.M.; SODERLING, S.; BURNS, F.; BEAVO, J.A. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, **135**: 67-104.
- KALSI, J.S.; REES, R.W.; HOBBS, A.; ROYLE, M.; KELL, P.D.; RALPH, D.J.; MONCADA, S.; CELLEK, S. BAY 41-2272, a novel nitric oxide independent soluble guanylate cyclase activator, relaxes human and rabbit corpus cavernosum in vitro. **The J. of Urol.**, **169**: 761-766, 2003.
- KANOFSKY, J.R.; HOOGLAND, H.; WEVER, R. & WEISS, S.J. Singlet oxygen production by human eosinophils. **J. Biol. Chem.**, **263**: 9692-9696, 1988.
- KAPLAN, S.S.; BILIAR, T.; CURRAN, R.D.; ZDZIARSKI, U.E.; SIMMONS, R.L. & BASFORD, R.E. Inhibition of chemotaxis with N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. **Blood**, **74**: 1885-1887, 1989.

- KITA, H.; OHNISHI, T.; OKUBO, Y.; WEILER, D.; ABRAMS, J.S. & GLEICH, J.G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. **J. Exp. Med.**, **174**: 745-748, 1991.
- KO, F.N., WU, C.C., KUO, S.C., LEE, F.Y., TENG, C.M. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. **Blood**, **84**: 4226-33, 1994.
- KOENDERMAN, L.; KUIJPERS, T.W.; BLOM, M.; TOOL, A.T.; ROOS, D. & VERHOEVEN, A.J. Characteristics of CR3-mediated aggregation in human eosinophils: Effect of priming by platelet-activating factor. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **87**: 947-954, 1991.
- KOSARIKOV, D.N.; LEE, J.M.; UVERSKY, V.N.; COUNTS-GERBER, N. Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. **J. Inorg. Bioche.**, **87**:267-76, 2001.
- KROEGEL, C.; VIRCHOW, J.R.; LUTTMAN, W.; WALKER, C. & WARNER, J.A. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophils leucocyte (Part I). **Eur. Respir. J.**, **7**: 519-543, 1994.
- KRUPINSKI, J.; COUSSEN, F.; BAKALYAR, H.A.;TANG, W.J.;FEINSTEIN, P.G.; ORTH, K.; SLAUGHTER, C. Adenylyl cyclase amino acid sequence: Possible channel-or transporter-like structure. **Science (Wash DC)**, **244**: 1558-1564, 1989.
- LAGENTE, V.; MOODLEY, I.; PERRIN, S.; MOTTIN, G.; JUNIEN, J.L. Effects of isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors on eosinophil infiltration in the guinea-pig lung. **Eur. J. Pharmacol.**, **255**: 253-6, 1994.
- LAGENTE, V.; PRUNIAUX, M.P.; JUNIEN, J.L.; MOODLEY, I. Modulation of cytokine-induced eosinophil infiltration by phosphodiesterase inhibitors. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, **151**: 1720-4, 1995.
- LAMAS, S.; MARSDEN, P.A.; LI, G.K.; TEMPST, P. & MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **89**: 6348-6352., 1992.
- LAMKHIOUED, B.; ADELBERT, D.; GOUNNI, A.S.; DELAPORTE, E.; GOLDMAN, M.; CAPRON, A. & CAPRON, M. Synthesis of cytokines by eosinophils and their regulation. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **107**: 122-123, 1995.
- LAMKHIOUED, B.; GOUNNI, A.S.; ALDEBERT, D.; DELAPORTE, D.; PRIN, L.; CAPRON, A. & CAPRON, M. Synthesis of type 1 (IFN- $\gamma$ ) and type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines by human eosinophils. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **796**: 203-208, 1996.

- LAMKHIOUED, B.; RENZI, P.M.; ABI-YOUNES, S.; GARCIA-ZEPADA, E.A.; ALLAKHVERDI, Z. & GHAFAR, O. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J. Immunol.*, **159**: 4593-4601, 1997.
- LIDBURY, P.S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Interactions of iloprost and sodium nitroprusside on vascular smooth muscle and platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 1275-1280, 1989.
- LIM, K.G.; WAN, H-C.; RESNICK, M.; WONG, D.T.W.; CRUIKSHANK, W.W.; KORNFELD, H.; CENTER, D.M. & WELLER, P.F. Human eosinophils release the lymphocyte and eosinophil active cytokines, RANTES and lymphocyte chemoattractant factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **107**: 342, 1995.
- LOHMANN, S.M.; VAANDRAGER, A.B.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; DE LONGE, H.R. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Bioch. Sci.*, **22**: 307-312, 1997.
- LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K.P. & WALDMAN, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.*, **52**: 375-413, 2000.
- LUTTMANN, W.; FRANZ, P.; MATTHYS, H. & VIRCHOW, J.C. Effects of TGF $\beta$  on eosinophil chemotaxis. *Scand. J. Immunol.*, **47**: 127-130, 1998.
- MAGHAZACHI, A.A. Intracellular signaling events at the leading edge of migrating cells. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**: 931-943, 2000.
- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D. & WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate. Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, **27**: 8706-8711, 1988.
- MARTIN, E., LEE, Y.C., MURAD, F. YC-1 activation of human soluble guanylyl cyclase has both heme-dependent and heme-independent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 12938-42, 2001.
- MARTIN, L.B.; KITA, H.; LEIFERMAN, K.M. & GLEICH, J.G. Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **109**: 207-215, 1996.
- MAXEY, K.M.; MADDIPATI, K.R. & BIRKMEIER, J. Interference in immunoassay. *J. Clin. Immunoassay*, **15**: 116-120, 1992.
- MELANI, C.; MATTIA, G.F.; SILVANI, A.; CARE, A.; RIVOLTINI, L.; PARMIANI, G. & COLOMBO, M.P. Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood*, **81**: 2744-2749, 1993.

- MILTENYI, S.; MULLER, W.; WEICHEL, W. & RADBRUCH, A. High gradient magnetic cell separation with MACS-alternative and complementation to fluorescence activated cell sorting. **Cytometry**, **11**: 231-238, 1990.
- MOILANEN, E.; VUORINEN, P.; KANKAANRANTA, H.; METSA-KETELA, T. & VAPAATALO. Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. **Br. J. Pharmacol.**, **109**: 852-858, 1993.
- MOQBEL, R.; HAMID, Q.; YING, S.; BARKANS, J.; HARTNELL, A.; TSICOPOULOS, A.; WARDLAW, A.J. & KAY, A.B. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. **J. Exp. Med.**, **174**: 749-752, 1991.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, **65**: 55-63, 1983.
- MOULIAN, N.; TRUFFAULT, F.; GAUDRY-TALARMAIN, Y.M.; SERRAF, A.; BERRIH-AKNIN, S. In vivo and in vitro apoptosis of human thymocytes are associated with nitrotyrosine formation. **Blood**, **97(11)**: 3521-30, 2001.
- MULLERSHAUSEN, F.; FRIEBE, A.; FEIL, R.; THOMPSON, W.J.; HOFMANN, F.; KOESLING, D.; Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. **The J. of Cell Biol.**, **160** (5): 719-727, 2003.
- MULLERSHAUSEN, F.; RUSSWURM, M.; THOMPSON, W.J.; LIU, L.; KOESLING, D.; FRIEBE, A. Rapid nitric oxide –induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. **The J. of Cell Biol.**, **155** (2): 271-278, 2001.
- MÜLSCH, A., BAUERSACHS, J., SCHAFER, A., STASCH, J.P., KAST, R., BUSSE, R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. **Br. J. Pharmacol.**, **120**: 681-9, 1997.
- MUNOZ, N.M.; DOUGLAS, I.; MAYER, D.; HERRNREITER, A.; ZHU, X.D. & LEFF, A.R. Eosinophil chemotaxis inhibited by 5-lipoxygenase blockade and leukotriene receptor antagonism. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **155**: 1398-1403, 1997.
- MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. **J. Clin. Invest.**, **78**: 1-5, 1986.
- MURAD, F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. **Recent. Prog. Horm. Res.**, **49**: 239-48, 1994.

- NAGATA, M.; FUKUDA, T.; NUMAO, T.; MAKINO, S. & DOHI, Y. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces migration of human eosinophils. *Arerugi*, **42**: 549-555, 1993.
- NICHOLSON, C.D.; SHAHID, M. Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes--their potential utility in the therapy of asthma. *Pulm. Pharmacol.*, **7**(1): 1-17, 1994.
- OHASHI, H.; MOTEGI, Y.; KITA, H.; GLEICH, G.J.; MIURA, T.; ISHIKAWA, M.; KAWAI, H. & FUKAMACHI, H. Sulochrin inhibits eosinophil activation and chemotaxis. *Inflamm. Res.*, **47**: 409-415, 1998.
- OHLSTEIN, E.H., WOOD, K.S., IGNARRO, L.J. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**: 187-98, 1982.
- OLIVEIRA, S.H.P.; FACCIOLI, L.H.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. Participation of interleukin-5 and interleukin-8 in the eosinophil migration induced by a large volume of saline. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **111**: 245-252, 1996.
- OLIVEIRA, S.H.P.; FACCIOLI, L.H.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. Role of resident peritoneal cells in eosinophil migration induced by saline. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **104**: 323-331, 1994.
- OWEN, W.F.; ROTHENBERG, M.E.; SILBERSTEIN, D.S.; GASSON, J.C.; STEVENS, R.L.; AUSTEN, K.F. & SOBERMAN, R.J. Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J. Exp. Med.*, **166**: 129-141, 1987.
- PALFRAMAN, R.T.; COLLINS, P.D.; SEVERS, N.J.; RPTHERY, S.; WILLIAMS, T.J. & RANKIN, S.M. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: The role of specific adhesion molecules and phosphatidyl-inositol 3-kinase. *J. Exp. Med.*, **188**: 1621-1632, 1998.
- PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S. & MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **153**: 1251-1256, 1988.
- PARMLEY, R.T. & SPICER, S.S. Cytochemical and ultrastructural identification of a small type granule in human late eosinophils. *Lab. Invest.*, **30**: 557-567, 1974.



- PONATH, P.D.; QIN, S.; POST, T.W.; WANG, J.; WU, L.; GERARD, N.P.; NEWMAN, W.; GERARD, C. & MACKAY, C.R. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. **J. Exp. Med.**, **183**: 2437-2448, 1996.
- POWELL, W.S.; CHUNG, D. & GRAVEL, S. 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent stimulator of human eosinophil migration. **J. Immunol.**, **154**: 4123-4132, 1995.
- PRADELLES, P. & GRASSI, J. Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. **Anal. Chem.**, **61**: 447, 1989.
- RAND, T.H.; SILBERSTEIN, D.S.; KORNFELD, H. & WELLER, P.F. Human eosinophils express functional interleukin 2 receptors. **J. Clin. Invest.**, **88**: 825-832, 1991.
- RANDOLPH, G.J. & FURIE, M.B. A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. **J. Immunol.**, **155**: 3610-3618, 1995.
- RESNICK, M.B. & WELLER, P.F. Mechanisms of eosinophil recruitment. **Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, **8**: 349-355, 1993.
- RIBEIRO-DIAS, F.; BARBUTO, J.A.M.; TSUJITA, M. & JANCAR, S. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine splenn cells by MTT assay: differential inhibition by PGE<sub>2</sub> and EDTA. **J. Immunol. Methods**, **241**: 121-129, 2000.
- RICHARDS, K.L. & MCCULLOUGH, J.M. A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. **Immunol. Commun.**, **13**: 49-62, 1984.
- RIMELE, T.; STURM, J. & ADAMS, L.M. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **245**: 102-111, 1988.
- ROTH, S.J.; CARR, M.W. & SPRINGER, T.A. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 3482-3602, 1995.
- ROTHENBERG, M.E. Eosinophilia. **New England J. Medicine**, **338**: 1592-1600, 1998.

- ROTHENBERG, M.E.; OWEN, W.F.; SILBERSTEIN, D.S.; WOODS, J.; SOBERMAN, R.J.; AUSTEN, K.F. & STEVENS, R.L. Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin-3. **J. Clin. Invest.**, **81**: 1986-1993, 1988.
- SALVEMINI, D.; DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R. & VANE, J.R. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **86**: 6328-6332, 1989.
- SÁNCHEZ-MADRID, F. & DEL POZO, M.A. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. **EMBO J.**, **18**: 501-511, 1999.
- SANDERSON, C.J. Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production, in **Immunopharmacology of Eosinophils** (Smith, H. & Cook, R.M. eds) pp 10-24, Academic Press, London, 1993.
- SANDERSON, C.J.; WARREN, D.J. & STRATH, M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differential *in vitro*: Its relationship to IL-3 and functional properties of eosinophils produced in culture. **J. Exp. Med.**, **162**: 60-74, 1985.
- SANDLER, J.A., GALLIN, J.I. & VAUGHN, M. Effect of serotonin carbamylcholine and ascorbic acid on leukocyte cyclic GMP and chemotaxis. **J. Cell Biol.**, **67**: 480-484, 1975.
- SCHWINGSHACKL, A.; MOQBEL, R., DUSZYK, M. Nitric oxide activates ATP-dependent K<sup>+</sup> channels in human eosinophils. **J. of Leuk. Biol.**, **71**: 807-812, 2002.
- SEMMLER, J.; WACHTEL, H.; ENDRES, S. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$  production by human mononuclear cells. **Int. J. Immunopharmacol.**, **15**(3): 409-13, 1993.
- SETHI, S. & DIKSHIT, M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. **Thromb. Res.**, **100**: 223-247, 2000.
- SHINDO, K.; KOIDE, K. & FUKUMURA, M. Paf-induced eosinophil chemotaxis increases during an asthmatic attack and is inhibited by prednisolone *in vivo* and *in vitro*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **237**: 146-151, 1997.
- SNYDERMAN, R. & GOETZL, E.J. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. **Science**, **213**: 830-837, 1981.

- SPADA, C.S.; KRAUSS, A.H.; NIEVES, A.L. & WOODWARD, D.F. Effects of leukotrienes B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) on motility of isolated normodense human eosinophils and neutrophils. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **400B**: 699-706, 1997.
- SPADA, C.S.; NIEVES, A.L.; KRAUSS, A.H-P. & WOODWARD, D.F. Comparison of leukotriene B<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> on human eosinophil motility *in vitro*. **J. Leukoc. Biol.**, **55**: 183-191, 1994.
- SPRY, C.J.F. The natural history of eosinophils, in **Immunopharmacology of Eosinophils** (Smith, H. & Cook, R.M. eds) pp 1-9, Academic Press, London, 1993.
- STASCH, J.P.; BECKER, E.M.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; DEMBOWSKY, K.; FEURER, A.; GERZER, R.; MINUYH, T.; PERZBORN, E.; PLEISS, U.; SCHRODER, H.; SCHROEDER, W.; STAHL, E.; STEINKE, W.; STRAUB, A. & SCHRAMM, M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, **410**: 212-215, 2001.
- STOSSEL, T.P. From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmatic actin assembly. **J. Biol. Chem.**, **264**: 18261-18264, 1989.
- STRAUB, A.; BENET-BUCHHOLZ, J.; FRÖDE, R.; KERN, A.; KOHLSDORFER, C.; SCHMITT, P.; SCHWARZ, T.; SIFERT, H.; STASCH, J.P. Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. **Bioorg. & Med. Chem.**, **10**: 1711-1717, 2002.
- STRAUB, A.; STASCH, J.P.; ALONSO-ALIJA, C.; BENET-BUCHHOLZ, J.; DUCKE, B.; FEURER, A.; FÜRSTNER, C. NO- independent stimulators of soluble guanylate cyclase. **Bioorg. & Med. Chem. Lett.**, **11**: 781-784, 2001.
- SULLIVAN, P.; BEKIR, S.; JAFFAR, Z.; PAGE, C.; JEFFERY, P.; COSTELLO, J. Anti-inflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. **Lancet.**, **343(8904)**: 1006-8, 1994.
- SZABÓ, C. & THIEMERMANN, C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Adv. Pharmacol.**, **34**: 113-153, 1995.
- TAHA, R.A.; MINSHALL, E.M.; MIOTTO, D.; SHIMBARA, A.; LUSTER, A. & HOGG, J.C. Eotaxin and monocyte chemotactic protein 4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **103**: 476-483, 1999.
- TEIXEIRA, M.M.; ROSSI, A.G.; GIEMYCZ, M.A.; HELLEWELL, P.G. Effects of agents which elevate cyclic AMP on guinea-pig eosinophil homotypic aggregation. **Br. J. Pharmacol.**, **118(8)**: 2099-2106.

- TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 1515-1521, 1993.
- TENOR, H.; HATZELMANN, A.; CHURCH, M.K.; SCHUDT, C.; SHUTE, J.K. Effects of theophylline and rolipram on leukotriene C4 (LTC4) synthesis and chemotaxis of human eosinophils from normal and atopic subjects. **Br. J. Pharmacol.**, **118**: 1727-351996.
- TESSIER, P.A.; NACCACHE, P.H.; CLARK-LEWIS, I.; GLADUE, R.P.; NEOTE, K.S. & MCCOLL, S.R. Chemokine networks *in vivo*: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation *in vivo* in response to TNF- $\alpha$ . **J. Immunol.**, **159**: 3595-3602, 1997.
- THOMAZZI, S.M.; FERREIRA, H.H.; CONRAN, N.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of nitric oxide on *in vitro* human eosinophil migration. **Biochem. Pharmacol.**, **62**: 1417-21, 2001.
- THOMAZZI, S.M.; MOREIRA, J.; MARCONDES, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, A. Role of cyclic GMP on inhibition by nitric oxide donors of human eosinophil chemotaxis *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, **141**: 653-660, 2004.
- TORPHY, T.J.; BARNETTE, M.S.; HAY, D.W.; UNDERWOOD, D.C. Phosphodiesterase IV inhibitors as therapy for eosinophil-induced lung injury in asthma. **Environ. Health Perspect.**, **102** (10): 79-84, 1994.
- UNDEM, B.J.; TORPHY, T.J.; GOLDMAN, D.; CHILTON, F.H. Inhibition by adenosine 3':5'-monophosphate of eicosanoid and platelet-activating factor biosynthesis in the mouse PT-18 mast cell. **J. Biol. Chem.**, **265**(12): 6750-8, 1990.
- VAN DER VLIET, A.; EISERICH, J.P.; SHIGENAGA, M.K.; CROSS, C.E. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathologic mechanism of disease? **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**: **160**: 1-9, 1999.
- WALSH, G.M.; HARTNELL, A.; WARDLAW, A.J.; KURIHARA, K.; SANDERSON, C.J. & KAY, A.B. IL-5 enhances the *in vitro* adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leukocyte (CD11/18)-dependent manner. **Immunology**, **71**: 258-265, 1990.
- WANG, J.M.; RAMBALDI, A.; BIONDI, A.; CHEN, Z.G.; SANDERSON, C.J. & MANTOVANI, A. Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. **Eur. J. Immunol.**, **19**: 701-705, 1989.
- WANIKIAT, P.; WOODWARD, D.F. & ARMSTRONG, R.A. Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. **Br. J. Pharmacol.**, **122**: 1135-1145, 1997.

- WARD, C.; WONG, T.H.; MURRAY, J.; RAHMAN, I.; HASLETT, C.; CHILVERS, E.R.; ROSSI, A.G. Induction of human neutrophil apoptosis by nitric oxide donors: evidence for a caspase-dependent, cyclic-GMP-independent, mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, **59(3)**: 305-14, 2000.
- WARDLAW, A.J.; MOQBEL, R. & KAY, A.B. The eosinophil leucocyte. In: **Textbook of Immunopharmacology**, Third Edition, ed. By M.M. Dale, J.C. Foreman & T-P.D. Fan, pp. 55-63, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.
- WARRINGA, R.A.J.; KOENDERMAN, L.; KOK, P.T.M.; KREUKNIET, J. & BRUIJNZEEL, P.L.B. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. **Blood**, **77**: 2694-2700, 1991.
- WELLER, P.F. The immunobiology of eosinophils. **N. Engl. J. Med.**, **324**: 1110-1118, 1991.
- WELLER, P.F.; RAND, T.H.; BARRET, T.; ELOVIC, A.; WONG, D.T. & FINBERG, R.W. Accessory cell function of human eosinophils: HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen presentation and interleukin-1 $\alpha$  formation. **J. Immunol.**, **150**: 2554-2562, 1993.
- WILKINSON, P.C. Cellular accumulation and inflammation. In: **Textbook of Immunopharmacology**, ed. by M.M. Dale, J.C. Foreman & T-P.D. Fan, pp. 218-231, Blackwell Scientific Publications, London, 1994.
- WINK, D.A. & MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med.**, **25**: 434-456, 1998.
- WOHLFART, P., MALINSKI, T., RUETTEN, H., SCHINDLER, U., LINZ, W., SCHOENAFINGER, K., STROBEL, H., WIEMER, G. Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase. **Br. J. Pharmacol.**, **128**: 1316-22, 1999.
- WU, C.C., KO, F.N., KUO, S.C., LEE, F.Y., TENG, C.M. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. **Br. J. Pharmacol.**, **116**: 1973-8, 1995.
- YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, Y.; SUYUMA, Y.; MIURA, Y.; KASAHARA, T.; KITAMURA, S.; TORISU, M.; MITA, S.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K. & SUDA, T. Highly purified murine interleukin-5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs *in vitro* survival: IL-5 is an eosinophil chemotactic factor. **J. Exp. Med.**, **167**: 1727-1742, 1988.

- YOUNG, J.D.; PETERSON, C.G.; VENGE, P. & COHN, Z.A. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. **Nature**, **321**: 613-616, 1986.
- ZANARDO, R.C.O.; COSTA, E.; FERREIRA, H.H.A.; ANTUNES, E.; MARTINS, A.R.; MURAD, F. & DE NUCCI, G. Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 14111-14114, 1997.
- ZHAO, Y.; BRANDISH, P.E.; DIVALENTIN, M.; SCHELVIS, J.P.; BABCOCK, G.T.; MARLETTA, M.A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, **39**: 10848-54, 2000.
- ZUCKER FRANKLIN, D. Eosinophil structure and maturation, in **The Eosinophil in Health and Disease** (Mahmoud, A.A.F. & Austen, K.F. eds) pp 43-60, Grune and Stratton, New York, 1980.

## **7. ANEXOS**

# Role of cyclic GMP on inhibition by nitric oxide donors of human eosinophil chemotaxis *in vitro*

\*<sup>1</sup>Sara M. Thomazzi, <sup>1</sup>Juliana Moreira, <sup>1</sup>Sisi Marcondes, <sup>1</sup>Gilberto De Nucci & <sup>1</sup>Edson Antunes

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, PO Box 6111, 13084-971, Campinas (SP), Brazil

**1** This study was designed to investigate the effects of the nitric oxide (NO) donors sodium nitroprusside (SNP), 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) and *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) on *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-phenylalanine (fMLP,  $1 \times 10^{-7}$  M)-induced human eosinophil chemotaxis, cyclic guanosine-3',5'-monophosphate (cGMP) levels, protein nitration and cytotoxicity.

**2** Human eosinophils were exposed to SNP, SIN-1 and SNAP (0.001–1.0 mM) for either short (10 min) or prolonged (90 min) time periods. Exposition of eosinophils with these NO donors significantly inhibited the eosinophil chemotaxis irrespective of whether cells were exposed to these agents for 10 or 90 min. No marked differences were detected among them regarding the profile of chemotaxis inhibition.

**3** Exposition of eosinophils to SNP, SIN-1 and SNAP (0.001–1.0 mM) markedly elevated the cGMP levels above basal levels, but the 90-min exposition resulted in significantly higher levels compared with the 10-min protocols ( $5.3 \pm 0.6$  and  $2.6 \pm 0.2$  nM  $1.5 \times 10^6$  cells $^{-1}$ , respectively). The cGMP levels achieved with SNAP were greater than SNP and SIN-1.

**4** The NO donors did not induce cell toxicity in any experimental condition used. Additionally, eosinophils exposed to SNP, SIN-1 and SNAP (1.0 mM each) either for 10 or 90 min did not show any tyrosine nitration in conditions where a strong nitration of bovine serum albumin was observed.

**5** Our findings show that inhibitory effects of fMLP-induced human eosinophil chemotaxis by NO donors at short or prolonged exposition time were accompanied by significant elevations of cGMP levels. However, additional elevations of cGMP levels do not change the functional profile (chemotaxis inhibition) of stimulated eosinophils.

*British Journal of Pharmacology* (2004) **141**, 653–660. doi:10.1038/sj.bjp.0705661

**Keywords:** cGMP levels; chemotaxis; cytotoxicity; eosinophil; protein nitration; nitric oxide; SIN-1; SNAP; sodium nitroprusside

**Abbreviations:** BSA, bovine serum albumin; cGMP, cyclic guanosine-3',5'-monophosphate; DMSO, dimethyl sulphoxide; fMLP, *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-phenylalanine; MEM, minimum essential medium; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; 3NT, 3-nitrotyrosine; ODQ, 1*H*-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-*z*] quinoxalin-1-one; ONOO $^-$ , peroxyntirite anion; PBS, phosphate-buffered saline; SIN-1, 3-morpholinosydnonimine; SNAP, *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine; SNP, sodium nitroprusside; TBS-T, Tris-buffered saline-tween

## Introduction

Nitric oxide (NO) is synthesized by many cell types, and participates in several physiopathological processes (Sethi & Dikshit, 2000). The action of NO is generally carried out through the activation of the soluble guanylyl cyclase, thereby increasing intracellular levels of cyclic guanosine-3',5'-monophosphate (cGMP), which acts as its second messenger (Murad, 1986). For this reason, cGMP is frequently used as a sensitive indirect measure of NO production. NO can be exogenously supplied to tissues and cells by various NO-generating compounds, each of with its own specific properties. These compounds have been useful for studying physiopathological processes and molecular mechanisms in which NO is involved. Several types of NO-releasing agents are available, including sydnonimines (3-morpholinosydnonimine, molsidomine), organic nitrates (glyceryl trinitrate) and nitrites (amyl nitrite), inorganic nitroso compounds (sodium nitro-

prusside (SNP)) and *S*-nitrosothiols (*S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), *S*-nitrosoglutathione) (Feelisch & Stamler, 1996; Moncada *et al.*, 1997). Such compounds have shown diverse and remarkable biological effects, and in some cases they appear to be opposed to one another, although differences in concentrations, incubation times or experimental conditions might explain the apparent contradictions (Ferrero *et al.*, 1999). SNP is an agent with either a nitroso or nitrosyl functional group that spontaneously releases small amounts of NO over long periods (Rao *et al.*, 1991; Bates *et al.*, 1992), while SNAP releases NO by mechanisms highly dependent on the components of a given system, particularly with regard to the concentration of reduced thiol and transition metals present (Dicks *et al.*, 1996; Gordge *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1996). The NO donor 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) is a co-donor of NO and superoxide anion (O $_2^-$ ) to form the peroxyntirite anion (ONOO $^-$ ; Feelisch *et al.*, 1989).

Eosinophils play an important role in host defense mechanisms in parasitic infestation and pathogenesis of allergic,

\*Author for correspondence: E-mail: thomazzi@directnet.com.br  
Advance online publication: 26 January 2004



immunological and malignant disorders (Giembycz & Lindsay, 1999). Previous studies demonstrated the existence of a functional NO-cGMP pathway in rat (Zanardo *et al.*, 1997) and human (Thomazzi *et al.*, 2001) purified eosinophils that modulates the *in vitro* locomotion of this cell type. *In vivo* treatment with NO synthesis inhibitor selectively attenuates the eosinophil infiltration in airways of allergic mice (Feder *et al.*, 1997; Koarai *et al.*, 2000; Iijima *et al.*, 2001) and rats (Ferreira *et al.*, 1998) as well as in pleural cavity of the rat stimulated with carrageenin (Ferreira *et al.*, 1996), thus corroborating the *in vitro* studies. Although cyclic nucleotides are known to modulate leukocyte activation processes, their role in cell locomotion is still controversial. In human isolated neutrophils and mononuclear cells, increase of cGMP levels has been shown to either stimulate (Kaplan *et al.*, 1989; Belenky *et al.*, 1993a,b; Wanikiat *et al.*, 1997) or inhibit (Schröder *et al.*, 1990; Bath *et al.*, 1991; Moilanen *et al.*, 1993; Kosonen *et al.*, 1999; Conran *et al.*, 2001) the *in vitro* chemotaxis and adhesion. On the other hand, the soluble guanylyl cyclase inhibitor 1*H*-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-*z*] quinoxalin-1-one (ODQ) has been clearly shown to reduce concentration-dependently *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-phenyl-alanine (fMLP)-induced eosinophil chemotaxis, suggesting a key role for cGMP in these cells (Zanardo *et al.*, 1997; Thomazzi *et al.*, 2001). The present study was designed to further clarify the relationship between *in vitro* eosinophil locomotion and intracellular concentrations of cGMP levels in this cell type. To achieve this, human isolated eosinophils were treated with varying concentrations of SNP, SNAP and SIN-1 under a short (10 min) or prolonged (90 min) exposure time, after which fMLP-induced chemotaxis, cGMP levels and cell viability were evaluated. Since protein nitration, possibly mediated by ONOO<sup>-</sup>, has been shown to mediate *in vivo* cGMP-independent actions (Brennan *et al.*, 2002), we have also evaluated the tyrosine nitration in eosinophils exposed to short and prolonged time to the NO donors.

## Methods

### Eosinophil isolation

Blood was collected from healthy volunteers (male and female volunteers, aged 18–50 years) who were not under medication. Informed consent and approval from the local ethical committee were obtained before the study.

Human eosinophils were isolated from peripheral blood using a method adapted from that of Hansel *et al.* (1991). Briefly, 120 ml blood collected in 3.13% (w v<sup>-1</sup>) sodium citrate from a healthy subject was diluted 1:1 with phosphate-buffered saline (PBS), and 35 ml diluted blood overlaid onto a 15 ml Percoll gradient (1.082 ± 0.005 g ml<sup>-1</sup>, pH 7.4, 340 mOsm kgH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>). Gradients were centrifuged at 1000 × *g* for 20 min at 4 °C (Hermle model Z360k centrifuge, Germany) and the cell pellet was collected. Red cells contained in the granulocyte pellet were lysed with lysing buffer (in mM: NH<sub>4</sub>Cl 155, KHCO<sub>3</sub> 10 and EDTA 0.1). Washed granulocytes were incubated with anti-CD16 immunomagnetic microbeads before passing on a steel-matrix column in a magnetic field, and the CD16-negative eosinophils were collected. Eosinophils (92–99% purity) were then resuspended in minimum essential

medium (MEM, pH 7.2). Contaminating cells were mononuclear cells.

### Experimental design: *in vitro* treatment of eosinophils

In order to explore the effects of NO donors on eosinophil chemotaxis, cGMP levels, protein nitration and cell toxicity, two experimental protocols varying the exposure time of NO donors with eosinophils were carried out. In the former protocols, eosinophil suspensions were exposed for 90 min to SNP, SIN-1, SNAP (0.001–1.0 mM each) or the vehicle dimethyl sulphoxide (DMSO, 0.3% for SNAP) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. In these 90-min exposition protocols, eosinophils were incubated for 30 min with the NO donors and maintained in contact with these drugs for another 60 min, which corresponded to the time spent in chemotaxis assay with fMLP (1 × 10<sup>-7</sup> M), thus performing a whole time period of 90 min of exposition to NO donors. In further experiments, eosinophil suspensions were exposed for short-term (10 min) periods to SNP, SIN-1, SNAP (0.1 mM each) or the vehicle DMSO (0.3% for SNAP) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. In these 10-min exposure protocols, cells were previously maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 20 min to mimic the conditions employed in 90-min exposition studies. Next, the NO donors were added to eosinophil suspension for 10 min, after which cells were washed and placed in the microchemotaxis chamber to carry out the chemotaxis assays for 60 min using fMLP (1 × 10<sup>-7</sup> M) as a chemoattractant agent.

### Chemotaxis assay

Eosinophils were resuspended at a concentration of 5 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup> in MEM/ovalbumin, and migration assays were performed using a 48-well microchemotaxis chamber (Richards & McCullough, 1984). The bottom wells of the chamber were filled with the chemoattractant agent fMLP (1 × 10<sup>-7</sup> M) in 28 µl MEM, whereas the upper wells were filled with eosinophils (50 µl) that had been treated or not with SNP, SIN-1, SNAP or diBu-cGMP. The bottom and upper cells were separated by a polycarbonate filter of 5 µm. The chamber was then incubated for 60 min at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At the end of the incubation period, the filter was removed, washed, fixed in methanol for 2 min, stained with Diff-Quik and mounted on a glass slide. Each incubation was carried out in triplicate and migration was determined by counting eosinophils that had migrated completely through the filter in five random high-power fields (HPF, × 1000) per well.

### Extraction and measurement of cGMP from eosinophils

Eosinophils were isolated and resuspended to a concentration of 1 × 10<sup>7</sup> cells ml<sup>-1</sup> in PBS. To achieve this number of eosinophils, a pool of three volunteers was used for each assay. Cells were incubated with the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX, 2 mM) for 30 min at room temperature before adding the NO donors. In order to mimic the conditions employed in the chemotaxis assays (10- and 90-min protocols), eosinophils were incubated (37 °C, humidified atmosphere) with the NO donors (0.001–1.0 mM each) for 10 or 90 min, after which the reaction was interrupted by the addition of cold acidified absolute ethanol to a final concentration of 67% (v v<sup>-1</sup>), and samples were

vigorously agitated by hand for 30 s. Cell samples were then incubated on ice for 30 min before centrifuging at  $4000 \times g$  for 30 min at 4 °C. The supernatants were collected and retained and the precipitates were washed with 0.5 ml 67% (v/v<sup>-1</sup>) acidified ethanol before centrifuging again at  $14,000 \times g$  for 5 min at room temperature. The supernatants from these washed samples were collected and added to the first supernatants collected and dried at 55–60 °C under a stream of nitrogen in a water bath and stored at –20 °C until measurement of cGMP. cGMP in  $1.5 \times 10^6$  cells well<sup>-1</sup> was measured using a Cayman kit according to Pradelles & Grassi (1989) and Maxey *et al.* (1992).

#### Western blot for 3-nitrotyrosine

Eosinophils were isolated, resuspended to a concentration of  $1 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> in Tris (50 mM, pH 7.4) and incubated (37 °C, humidified atmosphere) with SNP, SIN-1 and SNAP (1.0 mM each) for 10 or 90 min. A protease inhibitor cocktail (2.0 mM AEBSF, 1.6  $\mu$ M aprotinin, 42  $\mu$ M leupeptin, 72  $\mu$ M bestatin, 30  $\mu$ M pepstatin A and 28  $\mu$ M E-64) and EDTA (1.0 mM) were added to each sample, and stored at –80 °C until analysis. For the assay, frozen eosinophil samples were thawed, sonicated (5 min) and centrifuged ( $10,000 \times g$ , 4 °C) for 15 min. The eosinophil supernatant and precipitates were separated. The precipitates were resuspended in buffer (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA), sonicated (5 min), centrifuged ( $10,000 \times g$ , 15 min, 4 °C) and pellets discarded. The samples (supernatants from either thawed cells or precipitates) were assayed for protein concentration (Lowry method) using the Bio-Rad DC protein assay. Equivalent protein amounts (40  $\mu$ g) were loaded on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 7.5%). Following electrophoresis, samples, nitrated bovine serum albumin (BSA, made from the incubation of 1.0 mM peroxynitrite with 1 mg ml<sup>-1</sup> BSA for 5 min) and molecular weight standards, were electrophoretically transferred to PVDF membranes and blocked for 30 min at room temperature in solution containing 5% nonfat milk in Tris-buffered saline-tween (TBS-T, 20 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.3 M NaCl with 0.1% Tween-20). The membrane was incubated overnight in 5% nonfat milk containing a 1:2000 dilution of mouse monoclonal anti-nitrotyrosine antibodies at 4 °C. Next, the blot was washed eight times (10 min each) with TBS-T and then incubated with 5% nonfat milk containing 1:8000 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h while shaking at room temperature. The membrane was washed another eight times (10 min each) with TBS-T. Detection of nitrated proteins was performed by enhanced chemiluminescence (ECL plus Western blotting detection system).

#### MTT assay

Cell toxicity was estimated using the tetrazolium salt reduction test (MTT assay) by eosinophils after exposure to NO donors (Mosmann, 1983; Ribeiro-Dias *et al.*, 2000). Eosinophils were isolated and resuspended to a concentration of  $2 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> in MEM. Cells were exposed to SNP, SIN-1 or SNAP (0.001–1.0 mM each) for either 10 or 90 min at 37 °C in a humidified atmosphere. Eosinophils ( $100 \mu$ l well<sup>-1</sup>), treated or not, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT,  $10 \mu$ l well<sup>-1</sup>, 5 mg ml<sup>-1</sup> in PBS)

were added in triplicate to a 96-well plate. Cells were allowed to incubate for 3 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, 100  $\mu$ l of 10% SDS in 0.01 M HCl was added to each well. Cell samples were then incubated for 18 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> and absorbance measured at 540 nm in a microplate reader (Multiscan MS, Labsystems, U.S.A.).

#### Materials

VarioMACS system and microbeads were purchased from Miltenyi Biotec Inc. (Auburn, CA, U.S.A.). DMSO, MTT, fMLP, IBMX, MEM, 3-morpholininosydnonimine (SIN-1), SNAP, Percoll, protease inhibitor cocktail and SNP were purchased from Sigma (St Louis, MO, U.S.A.). Polycarbonate filter (5  $\mu$ m) was obtained from Nuclepore (Pleasanton, CA, U.S.A.). Diff-Quik was obtained from Baxter Healthcare Corp. (DE, U.S.A.). Kit for measurement of cGMP was obtained from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, U.S.A.). PVDF membranes and Bio-Rad DC protein assay kit were purchased from Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.). Mouse monoclonal anti-nitrotyrosine antibodies were purchased from Upstate Biotechnology (MA, U.S.A.). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, molecular weight standards and ECL plus Western blotting detection system were purchased from Amersham Biosciences Corp. (NJ, U.S.A.).

#### Statistical analysis

Data are expressed as the mean values  $\pm$  s.e.m. of at least three separate experiments carried out in triplicate. Data were analysed by analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons followed by Tukey's test, or unpaired Student *t*-test when appropriate. A value of  $P < 0.05$  was taken as significant.

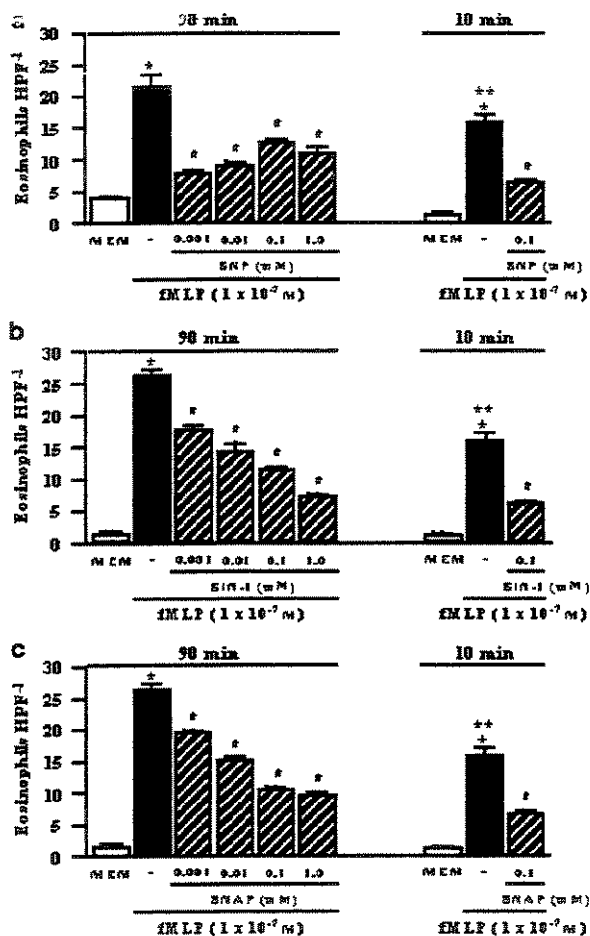
## Results

#### Effect of NO donors on the fMLP-stimulated eosinophil chemotaxis

Activation of human eosinophils (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) with fMLP ( $1 \times 10^{-7}$  M) induced a significant cell chemotaxis compared to random migration ( $P < 0.001$ ). However, chemotactic responses to fMLP were about 1.5 times higher ( $P < 0.05$ ) in the 90-min in comparison with the 10-min exposure protocols (Figure 1).

Figure 1 shows that exposure of human eosinophils for 90 min (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) to 0.001–1.0 mM of NO donors ( $n = 3$  individuals, each in triplicate) significantly inhibited ( $P < 0.001$ ) the fMLP-induced chemotaxis in all concentrations used. The chemotaxis inhibition by SIN-1 and SNAP followed a clear concentration-dependent response, whereas inhibition by SNP reached maximum response with the first concentration used (0.001 mM). The vehicle DMSO (0.3% for SNAP) had no significant effect on fMLP-induced eosinophil chemotaxis compared to untreated cells ( $26.2 \pm 0.9$  and  $24.2 \pm 0.6$  eosinophils HPF<sup>-1</sup>, untreated cells and DMSO, respectively).

In separate experiments, 10-min exposure protocols (see Methods) were carried out using eosinophils that have been

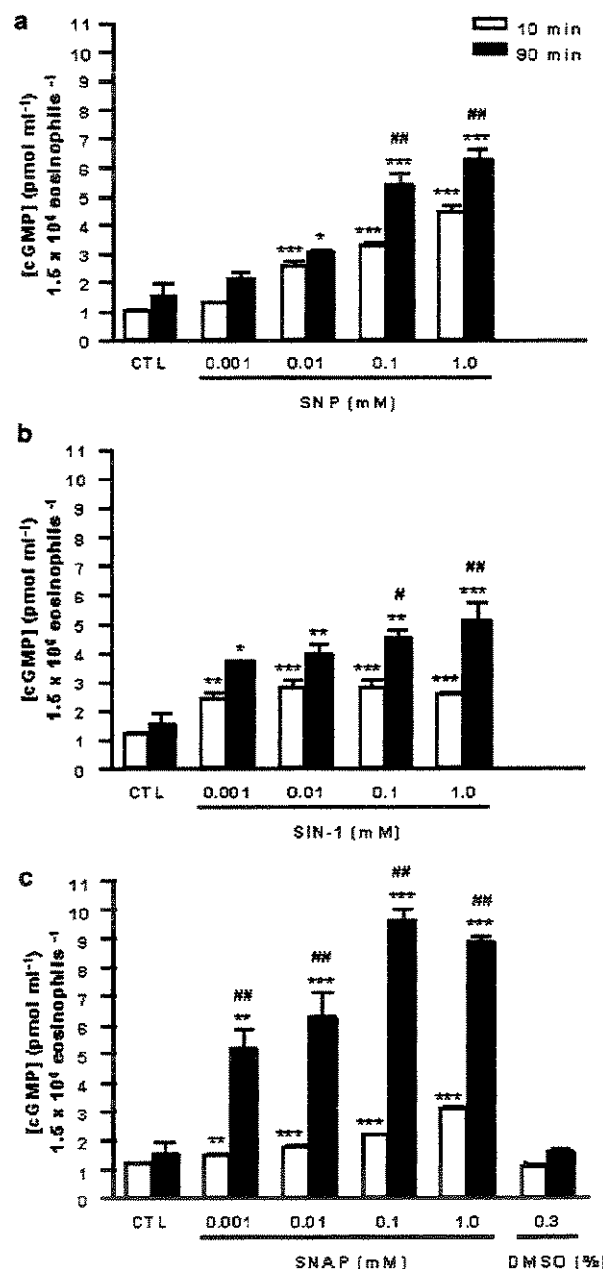


**Figure 1** Inhibitory effects of NO donors on fMLP ( $1 \times 10^{-7}$  M)-stimulated eosinophil chemotaxis. The human eosinophil suspension ( $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) was exposed for 90 or 10 min with the NO donors SNP (panel a), SIN-1 (panel b) or SNAP (panel c) in concentrations of 0.001–1.0 mM each. Control migration (fMLP) is represented by the solid column, whereas random chemotaxis (MEM, in the absence of fMLP) is represented by the open column in both conditions. Each experiment was carried out in triplicate ( $n=3$ ). Eosinophil migration is expressed as the mean number of migrated cells per HPF. The results are shown as the mean values  $\pm$  s.e.m. \* $P < 0.001$  compared to respective MEM, \*\* $P < 0.05$  compared to fMLP alone at 90 min, # $P < 0.001$  compared to respective fMLP.

preincubated for 20 min at 37 °C in the absence of drugs prior to the addition of the NO donors. Using this protocol, a marked reduction ( $P < 0.001$ ) of fMLP-induced chemotaxis by the NO donors SNP, SIN-1 and SNAP (0.1 mM each) was also observed (Figure 1).

#### Effect of NO donors on intracellular levels of cGMP in eosinophils

Treatment of eosinophils with SNP (0.001–1.0 mM;  $n=3$  individuals, each in triplicate) for 10 min (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) concentration-dependently increased the cGMP levels (Figure 2a). A concentration-dependent increase in cGMP levels was also observed when eosinophils were exposed for long time periods (90 min) to this NO donor ( $P < 0.05$ ; Figure 2a). In addition, the levels of this cyclic nucleotide in



**Figure 2** Effect of NO donors on intracellular levels of cGMP in eosinophils after 10 min (open columns) or 90 min (closed columns) of exposition. The human eosinophil suspension ( $1.5 \times 10^6$  cells  $\text{well}^{-1}$ ) was incubated (37 °C) with the NO donors SNP (panel a), SIN-1 (panel b), SNAP (panel c) or DMSO (panel c). Unstimulated cells are represented by CTL (control). Each experiment was carried out in triplicate ( $n=3$ ). The levels of cGMP are expressed in  $\text{pmol mL}^{-1}$   $1.5 \times 10^6$  eosinophils<sup>-1</sup>. The results are shown as the mean values  $\pm$  s.e.m. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to respective MEM, # $P < 0.05$  and ## $P < 0.001$  compared to 10-min incubation.

this latter protocol (90-min treatment) were 62 and 41% higher ( $P < 0.001$ ) compared to 10-min incubation at concentrations of 0.1 and 1.0 mM, respectively.

Treatment of eosinophils with SIN-1 (0.001–1.0 mM;  $n=3$  individuals, each in triplicate) for 10 min increased the cGMP

levels by approximately 1.9- to 2.3-fold ( $P < 0.01$ ) irrespective of the concentration used (Figure 2b). Treatment of eosinophils with SIN-1 (0.001–1.0 mM;  $n = 3$  individuals, each in triplicate) for 90 min caused a marked and concentration-dependent increase in cGMP levels (Figure 2b). The levels of cGMP in this latter protocol were 54, 39, 58 ( $P < 0.05$ ) and 96% higher ( $P < 0.001$ ) compared to 10-min incubation at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1 and 1.0 mM, respectively.

Treatment of eosinophils with SNAP (0.001–1.0 mM;  $n = 3$  individuals, each in triplicate) for 10 min concentration-dependently increased the cGMP levels (Figure 2c). Treatment of eosinophils with the same concentrations of SNAP ( $n = 3$ ) for 90 min also caused a concentration-dependent increase in cGMP levels (Figure 2c). The levels of cGMP in this latter protocol were 246, 257, 343 and 191% higher ( $P < 0.001$ ) compared to 10-min incubation at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1 and 1.0 mM, respectively. The vehicle DMSO (0.3%) alone had no effect on intracellular level of cGMP (Figure 2c).

In addition, incubation of eosinophils with SNAP (0.001–1.0 mM) for 90 min generated higher cGMP levels compared to equimolar concentrations of SNP and SIN-1 using the same incubation protocols.

In separate assays, incubation of eosinophils with fMLP ( $1 \times 10^{-7}$  M) for 10 or 90 min significantly elevated the cGMP levels ( $9.4 \pm 0.1$  and  $7.7 \pm 0.2$  pmol ml $^{-1}$   $1.5 \times 10^6$  eosinophils $^{-1}$ , respectively) compared with unstimulated cells ( $1.4 \pm 0.03$  and  $1.7 \pm 0.001$  pmol ml $^{-1}$   $1.5 \times 10^6$  eosinophils $^{-1}$ , respectively;  $n = 3$ ).

#### Western blot analysis of tyrosine nitration

Western blot analysis showed a very strong nitration of BSA ( $5 \mu\text{g well}^{-1}$ ) (data not shown); however, the eosinophil samples exposed to SNP, SIN-1 and SNAP (1.0 mM each) for 10 or 90 min ( $40 \mu\text{g well}^{-1}$ ) did not show any tyrosine-nitrated proteins, even when the autoradiography film was exposed as long as 30 min.

#### Effect of NO donors on the eosinophils cytotoxicity

The MTT reduction assay showed that neither the short (10 min) nor the prolonged (90 min) exposure time of SNP, SIN-1 or SNAP (0.001–1.0 mM each;  $n = 3$  individuals) to human eosinophils caused any toxic effect; instead, an increase in cell activity was observed in both protocols for the NO donors (Figure 3). The vehicle used for SNAP (0.3% DMSO) also failed to affect cell toxicity (data not shown).

#### Discussion

We demonstrated in this study that the NO donors SNP, SIN-1 and SNAP exhibit a marked inhibitory effect on the fMLP-induced human eosinophil chemotaxis irrespective of whether eosinophils were exposed to short (10 min) or prolonged (90 min) time periods. This inhibitory effect is suggested to be unrelated to additional elevations of cGMP levels provided the prolonged exposition resulted in approximately two-fold higher levels of this cyclic nucleotide compared with the short-incubation experiments; yet the pattern of chemotaxis inhibition was basically the same.

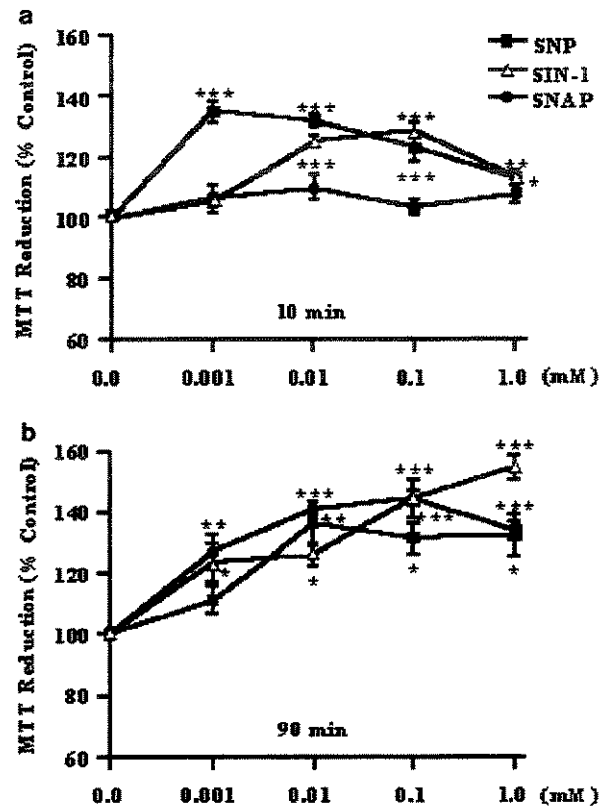


Figure 3 Effect of NO donors on eosinophils by MTT assay. The human eosinophil suspension ( $2 \times 10^6$  cells ml $^{-1}$ ) was incubated (37 °C) for 10 min (panel a) or 90 min (panel b) with the NO donors SNP, SIN-1 or SNAP in concentrations of 0.001–1.0 mM each. Each experiment (mean values  $\pm$  s.e.m.) was carried out in triplicate ( $n = 3$ ). The result is expressed in MTT reduction (% control). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to respective untreated cells.

The role of NO in cell locomotion is still controversial and opposite effects have been described depending on the experimental models and species employed. The use of different nitric oxide synthase (NOS) inhibitors or NO donors has indicated that endogenous NO may limit (Kubes *et al.*, 1991; Gaboury *et al.*, 1993; Kurose *et al.*, 1994; 1995) or potentiate (Ferreira *et al.*, 1996; 1998; Feder *et al.*, 1997) the leukocyte adhesion and/or recruitment into normal or inflamed microcirculation. Stimulation or attenuation of leukocyte activity has also been described in isolated cells with the use of NOS inhibitors or NO donors (Kaplan *et al.*, 1989; Belenky *et al.*, 1993a, b; Moilanen *et al.*, 1993; Beauvais *et al.*, 1995; Zanardo *et al.*, 1997; Okayama *et al.*, 1998; Kosonen *et al.*, 1999; Thomazzi *et al.*, 2001). Although these discrepancies have not been clarified yet, it has been suggested that variations in cGMP levels may explain these opposite effects. Thus, high concentrations of NO donors have been shown to inhibit neutrophil chemotaxis, whereas lower NO concentrations increase this response, suggesting a biphasic regulation of chemotaxis by the NO–cGMP pathway (VanUffelen *et al.*, 1996; Wanikiet *et al.*, 1997). Other studies carried out with polymorphonuclear leukocytes have suggested that response to NO donors is cGMP-independent at low

concentrations, and cGMP-dependent at high concentrations (VanUffelen *et al.*, 1998; Sethi *et al.*, 1999; Sethi & Dikshit, 2000). Recently, we have shown that eosinophils increase cGMP levels in response to SNP (Conran *et al.*, 2001), but to our knowledge, no study until now has attempted to correlate the cGMP levels with the *in vitro* eosinophil chemotaxis. Our results showed that a short-time (10 min) exposure of increasing concentrations of SNP, SIN-1 or SNAP to human eosinophils elevated the cGMP levels by approximately 1.5- to 4.5-fold, and significantly reduced the fMLP-induced chemotaxis. Similarly, a prolonged exposure (90 min) of human eosinophils to these compounds increased the cGMP levels by approximately 3- to 10-fold, and such increases were also associated with significant reductions in fMLP-induced chemotaxis in the same extension as those observed in the short-exposure experiments. This indicates that additional elevations of cGMP levels do not change the functional profile (chemotaxis inhibition) of fMLP-stimulated eosinophils. Data with SNAP reinforce this concept since the cGMP levels achieved at 90 min with this agent are markedly higher than those obtained at 10 and 90 min in comparison with other NO donors, but the inhibitory concentration-response pattern of chemotaxis is about the same. In human platelets, SNAP has been shown to produce higher levels of cGMP compared with SNP due to its ability to release higher amounts of NO (Gordge *et al.*, 1998). Therefore, it is likely that the inhibitory actions of the NO donors on eosinophil chemotaxis do not directly correlate with the intracellular cGMP elevations.

At this point, it is worth mentioning that eosinophils exposed for 90 min exhibited substantially higher (approximately 1.5-fold) chemotactic responses to fMLP than did cells exposed for 10 min. The implication of this finding is not entirely clear, but it is known that primed eosinophils obtained from atopic dermatitis (Bruijnzeel *et al.*, 1993) and allergic rhinitis (Ferreira *et al.*, 2002) patients show an increased migratory response to different chemotactic agents, including fMLP, platelet-activating factor and eotaxin. Priming by cytokines in neutrophils has been associated with sequential changes in fMLP receptor number and affinity, which may enhance different physiologic responses (Weisbart *et al.*, 1986). Taken into consideration that the only difference in untreated eosinophils is that in 10-min protocols cells were washed immediately before submission to chemotaxis assay, whereas in the 90-min protocols this washing step was not performed, it is likely that during the prolonged exposition at 37 °C eosinophils spontaneously release factors (e.g. platelet-activating factor, interleukin-5) that amplify their own responses to fMLP. However, our findings that NO donors inhibit the cell chemotaxis independently of the exposition time indicate that signalling mechanisms triggered by fMLP in both of the conditions used (10- and 90-min exposition) do not influence the resulting inhibition of chemotaxis. This is reinforced by data showing that incubation of eosinophils with fMLP for 10 or 90 min equally elevated the cGMP content above basal levels. It is worth pointing out that incubation of eosinophils with fMLP in order to measure the cGMP levels does not necessarily reflect the conditions of the functional assays, since in chemotaxis assays eosinophils are not in direct contact with fMLP but rather are separated by a polycarbonate filter. Measurement of cGMP levels in migrated cells into the filter has not been performed by methodological limitations.

It has been suggested that beneficial (physiological) actions of NO are mediated predominantly *via* activation of soluble guanylyl cyclase (i.e. cGMP-dependent) while detrimental (pathological) actions of NO are exerted primarily *via* direct (i.e. cGMP-independent) modifications of proteins (Hobbs, 2002). It is well established that NO can react with either superoxide or oxygen, yielding reactive nitrogen oxide species. These effects include the oxidation, nitrosation and nitration chemistry (Hanafy *et al.*, 2001). The former includes one or two electron removal from substrate, as well as hydroxylation reactions. Nitrosation occurs when an equivalent of nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ) is added to an amine, thiol, or hydroxy aromatic group. For instance, intermediates in the  $\text{NO}/\text{O}_2$  reaction convert thiol peptides to *S*-nitrosothiol peptides. Lastly, nitration of aromatic groups involves the addition of an equivalent of a nitrogen dioxide ( $\text{NO}_2^+$ ), and this includes the formation of nitrotyrosine from different reactive nitrogen oxide species such as  $\text{ONOO}^-$  (Wink & Mitchell, 1998). Peroxynitrite is a powerful oxidant, which can lead to the generation of other reactive radical species (Beckman & Koppenol, 1996). The eosinophilic inflammatory response in asthma is associated with protein nitration, detected as immunostaining for 3-nitrotyrosine (3NT), possibly resulting from the action of  $\text{ONOO}^-$  (Saleh *et al.*, 1998). Furthermore,  $\text{ONOO}^-$  attenuates eotaxin-induced eosinophil chemotactic activity *in vitro* suggesting that nitration of a tyrosine residue is responsible for inhibition of this effect (Sato *et al.*, 2000). Recent observations have also suggested that the action of peroxidases, including eosinophil peroxidase and myeloperoxidase, may be responsible for protein nitration (Duguet *et al.*, 2001; Brennan *et al.*, 2002). However, it is unlikely that mechanisms determining reduction of eosinophil chemotaxis by NO donors exposition in our study are consequence of cGMP-independent mechanisms, such as protein nitration, provided no tyrosine nitration could be detected in our assays that mimicked the functional assays.

A number of studies have reported that cytotoxicity as a result of long-lasting NO generation initiates apoptosis (Beauvais & Joly, 1999; Ward *et al.*, 2000; Moulian *et al.*, 2001). Although NO itself is not a powerful cytotoxic agent, it can render cells susceptible to other cytotoxic agents such as heavy metals, alkylating agents and radiation (Wink & Mitchell, 1998). However, the MTT assay revealed no cell toxicity with any of the concentrations of NO donors used, ruling out the possibility that decreased chemotaxis of eosinophils with the prolonged exposure to NO donors reflects cell death.

Two hypotheses could be raised to explain our results in eosinophils: (i) desensitization of the NO-cGMP signalling and/or (ii) activation of  $\text{K}^+$  channels. The first phenomenon has been demonstrated in human platelets (Mullershausen *et al.*, 2001; 2003) where incubations of these blood elements with the NO donor DEA-NO rapidly led to a reduction of the NO-induced cGMP response, as evidenced by increase in phosphodiesterase-5 activity and enzyme phosphorylation, both of which were abolished in the presence of the soluble guanylyl cyclase inhibitor ODQ. Therefore, it is plausible to speculate that increase of cGMP concentrations in human eosinophils (and/or prolonged exposure) leads to a short-term desensitization response, downregulating the cell chemotaxis. The second possibility has been evidenced in human eosinophils, where SNAP has recently been shown to induce an

outflow of  $K^+$  ions, causing membrane hyperpolarization thereby reducing cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentrations (Schwingshacki *et al.*, 2002). It is also likely therefore that this mechanism contributes to the NO-mediated reduction of eosinophil chemotaxis.

In conclusion, our study revealed that exposure to NO donors produces an inhibitory, noncytotoxic, effect on human eosinophil chemotaxis that neither depends on exposure time

nor on additional elevations of cGMP levels. This inhibitory effect cannot either be attributed to tyrosine nitration in eosinophils.

Sara M. Thomazzi is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Edson Antunes thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

- BATES, J.N., BAKER, M.T., GUERRA, R. & HARRISON, D.G. (1992). Chemical release of nitric oxide from sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 916–922.
- BATH, P.M.W., HASSALL, D.G., GLADWIN, A.-M., PALMER, R.M.J. & MARTIN, J.F. (1991). Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium *in vitro*. *Arterioscler. Thromb.*, **11**, 254–260.
- BEAUVAIS, F. & JOLY, F. (1999). Effects of nitric oxide on the eosinophil survival *in vitro*. A role for nitrosyl-heme. *FEBS Lett.*, **443**, 37–40.
- BEAUVAIS, F., MICHEL, L. & DUBERTRET, L. (1995). The nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. *FEBS Lett.*, **361**, 229–232.
- BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, **271**, C1424–C1437.
- BELENKY, S.N., ROBBINS, R.A., RENNARD, S.I., GOSSMAN, G.L., NELSON, K.J. & RUBINSTEIN, I. (1993a). Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.*, **122**, 388–394.
- BELENKY, S.N., ROBBINS, R.A. & RUBINSTEIN, I. (1993b). Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J. Leukoc. Biol.*, **53**, 498–503.
- BRENNAN, M.L., WU, W., FU, X., SHEN, Z., SONG, W., FROST, H., VADSETH, C., NARINE, L., LENKIEWICZ, E., BORCHERS, M.T., LUSIS, A.J., LEE, J.J., LEE, N.A., ABUSOUD, H.M., ISCHIROPOULOS, H. & HAZEN, S.L. (2002). A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation *in vivo* using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.*, **277**, 17415–17427.
- BRUIJNZEEL, P.L.B., KUPER, P.H.M., RIHS, S., BETZ, S., WARRINGA, R.A.J. & KOENDERMAN, L. (1993). Eosinophil migration in atopic dermatitis I: increased migratory response to *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, neutrophil-activating factor, platelet-activating factor and platelet factor 4. *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 137–142.
- CONRAN, N., FERREIRA, H.H.A., LORAND-METZE, I., THOMAZZI, S.M., ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. (2001). Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms *in vitro* by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 632–638.
- DICKS, A.P., SWIFT, H.R., WILLIAMS, D.L.H., BUTLER, A.R., ALSA'DONI, H.H. & COX, B.G. (1996). Identification of  $Cu^+$  as the effective reagent in nitric oxide formation from *S*-nitrosothiols (RSNO). *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 481–487.
- DUGUET, A., IJIMA, H., EUM, S.-Y., HAMID, Q. & EIDELMAN, D.H. (2001). Eosinophil peroxidase mediates protein nitration in allergic airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **164**, 1119–1126.
- FEDER, L.S., STELTS, D., CHAPMAN, R.W., MANFRA, D., CRAWLEY, Y., JONES, H., MINICOZZI, M., FERNANDEZ, X., PASTER, T., EGAN, R.W., KREUTNER, W. & KUNG, T.T. (1997). Role of nitric oxide on eosinophilic lung inflammation in allergic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **17**, 436–442.
- FEELISCH, M., OSTROWSKI, J. & NOACK, E. (1989). On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **14**, S13–S22.
- FEELISCH, M. & STAMLER, J.S. (1996). Donors of nitrogen oxides. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, ed. Feelisch, M. & Stamler, J.S. pp. 71–115. New York: Wiley and Sons Ltd.
- FERREIRA, H.H.A., BEVILACQUA, E., GAGIOTI, S.M., DE LUCA, I.M.S., ZANARDO, R.C.O., TEIXEIRA, C.E., SANNOMIYA, P., ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. (1998). Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **358**, 253–259.
- FERREIRA, H.H.A., LODO, M.L.S., MARTINS, A.R., KANDRATAVICIUS, L., SALAROLI, A.F., CONRAN, N., ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. (2002). Expression of nitric oxide synthases and *in vitro* migration of eosinophils from allergic rhinitis subject. *Eur. J. Pharmacol.*, **442**, 155–162.
- FERREIRA, H.H.A., MEDEIROS, M.V., LIMA, C.S.P., FLORES, C.A., SANNOMIYA, P., ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. (1996). Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur. J. Pharmacol.*, **310**, 201–207.
- FERRERO, R., RODRIGUEZ-PASCUAL, F., MIRAS-PORTUGAL, M.T. & TORRES, M. (1999). Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: correlation with nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 779–787.
- GABOURY, J., WOODMAN, R.C., GRANGER, D.N., REINHARDT, P. & KUBES, P. (1993). Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am. J. Physiol.*, **265**, H862–H867.
- GIEMBYCZ, M.A. & LINDSAY, M.A. (1999). Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 213–339.
- GORDGE, M.P., HOTHERSALL, J.S., NEILD, G.H. & DUTRA, A.A. (1996). Role of a copper (I)-dependent enzyme in the anti-platelet action of *S*-nitrosoglutathione. *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 533–538.
- GORDGE, M.P., HOTHERSALL, J.S. & NORONHA-DUTRA, A.A. (1998). Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of *S*-nitrosoglutathione. *Br. J. Pharmacol.*, **124**, 141–148.
- HANAFY, K.A., KRUMENACKER, J.S. & MURAD, F. (2001). NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.*, **7**, 801–819.
- HANSEL, T.T., DE VRIES, L.J.M., IFF, T., RIHS, S., WANDZILAK, M., BETZ, S., BLASER, K. & WALKER, C. (1991). An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J. Immunol. Methods*, **145**, 105–110.
- HOBBS, A.J. (2002). Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 637–640.
- IJIMA, H., DUGUET, A., EUM, S.-Y., HAMID, Q. & EIDELMAN, D.H. (2001). Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **163**, 1233–1240.
- KAPLAN, S.S., BILLIAR, T., CURRAN, R.D., ZDZIARSKI, U.E., SIMMONS, R.L. & BASFORD, R.E. (1989). Inhibition of chemotaxis with *N*G-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood*, **74**, 1885–1887.
- KOARAI, A., ICHINOSE, M., SUGIURA, H., YAMAGATA, S., HATTORI, T. & SHIRATO, K. (2000). Allergic airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration is reduced by a selective iNOS inhibitor, 1400W, in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **13**, 267–275.
- KOSONEN, O., KANKAANRANTA, H., MALO-RANTA, U. & MOILANEN, E. (1999). Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **382**, 111–117.
- KUBES, P., SUZUKI, M. & GRANGER, D.N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 4651–4655.

- KUROSE, I., WOLF, R., GRISHAM, M.B., AW, T.Y., SPECIAN, R.D. & GRANGER, D.N. (1995). Microvascular responses to inhibition of nitric oxide production. Role of active oxidants. *Circ. Res.*, **76**, 30–39.
- KUROSE, I., WOLF, R., GRISHAM, M.B. & GRANGER, D.N. (1994). Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ. Res.*, **74**, 376–382.
- MAXEY, K.M., MADDIPATI, K.R. & BIRKMEIER, J. (1992). Interference in immunoassay. *J. Clin. Immunoassay*, **15**, 116–120.
- MOILANEN, E., VUORINEN, P., KANKAANRANTA, H., METSA-KETELÄ, T. & VAPAATALO, H. (1993). Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leukocyte functions. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 852–858.
- MONCADA, S., HIGGS, A. & FURCHGOTT, R. (1997). International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol. Rev.*, **49**, 137–142.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63.
- MOULAN, N., TRUFFAULT, F., GAUDRY-TALARMAIN, Y.M., SERRAF, A. & BERRI-HAKININ, S. (2001). *In vivo* and *in vitro* apoptosis of human thymocytes are associated with nitrotyrosine formation. *Blood*, **97**, 3521–3530.
- MULLERSHAUSEN, F., FRIEBE, A., FEIL, R., THOMPSON, W.J., HOFMANN, F. & KOESLING, D. (2003). Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J. Cell Biol.*, **160**, 719–727.
- MULLERSHAUSEN, F., RUSSWURM, M., THOMPSON, W.J., LIU, L., KOESLING, D. & FRIEBE, A. (2001). Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J. Cell Biol.*, **155**, 271–278.
- MURAD, F. (1986). Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. *J. Clin. Invest.*, **78**, 1–5.
- OKAYAMA, N., ICHIKAWA, H., COE, L., ITOH, M. & ALEXANDER, J.S. (1998). Exogenous NO enhances hydrogen peroxide-mediated neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **274**, L820–L826.
- PRADELLES, P. & GRASSI, J. (1989). Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate and guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate using acetylcholinesterase. *Anal. Chem.*, **61**, 447.
- RAO, D.N.R., ELGUINDI, S. & O'BRIEN, P.J. (1991). Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **286**, 30–37.
- RIBEIRO-DIAS, F., BARBUTO, J.A.M., TSUJITA, M. & JANCAR, S. (2000). Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine splen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE<sub>2</sub> and EDTA. *J. Immunol. Methods*, **241**, 121–129.
- RICHARDS, K.L. & MCCULLOUGH, J. (1984). A modified micro-chamber method for chemotaxis and chemokinesis. *Immunol. Commun.*, **13**, 49–62.
- SALEH, D., ERNST, P., LIM, S., BARNES, P.J. & GIAID, A. (1998). 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.*, **12**, 929–937.
- SATO, E., SIMPSON, K.L., GRISHAM, M.B., KOYAMA, S. & ROBBINS, R.A. (2000). Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on eotaxin-induced eosinophil chemotactic activity *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **22**, 61–67.
- SCHRÖDER, H., NEY, P., WODITSCH, I. & SCHRÖR, K. (1990). Cyclic GMP mediates SIN-1-induced inhibition of human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **182**, 211–218.
- SCHWINGSHACKL, A., MOQBEL, R. & DUSZYK, M. (2002). Nitric oxide activates ATP-dependent K<sup>+</sup> channels in human eosinophils. *J. Leukoc. Biol.*, **71**, 807–812.
- SETHI, S. & DIKSHIT, M. (2000). Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb. Res.*, **100**, 223–247.
- SETHI, S., SINGH, M.P. & DIKSHIT, M. (1999). Nitric oxide-mediated augmentation of polymorphonuclear free radical generation after hypoxia-reoxygenation. *Blood*, **93**, 333–340.
- SINGH, R.J., HOGG, N., JOSEPH, J. & KALYANARAMAN, B. (1996). Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18596–18603.
- THOMAZZI, S.M., FERREIRA, H.H.A., CONRAN, N., DE NUCCI, G. & ANTUNES, E. (2001). Role of nitric oxide on *in vitro* human eosinophil migration. *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 1417–1421.
- VANUFFELEN, B.E., DE KOSTER, B.M., VAN DEN BROEK, P.J.A., VANSTEVENINCK, J. & ELFERINK, J.G.R. (1996). Modulation of neutrophil migration by exogenous gaseous nitric oxide. *J. Leuk. Biol.*, **60**, 94–100.
- VANUFFELEN, B.E., VAN DER ZEE, J., DE KOSTER, B.M., VANSTEVENINCK, J. & ELFERINK, J.G.R. (1998). Sodium azide enhances neutrophil migration and exocytosis: involvement of nitric oxide, cyclic GMP and calcium. *Life Sci.*, **63**, 645–657.
- WANKIAT, P., WOODWARD, D.F. & ARMSTRONG, R.A. (1997). Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 1135–1145.
- WARD, C., WONG, T.H., MURRAY, J., RAHMAN, I., HASLETT, C., CHILVERS, E.R. & ROSSI, A.G. (2000). Induction of human neutrophil apoptosis by nitric oxide donors: evidence for a caspase-dependent, cyclic-GMP-independent, mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 305–314.
- WEISBART, R.H., GOLDE, D.W. & GASSON, J.C. (1986). Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors. *J. Immunol.*, **137**, 3584–3587.
- WINK, D.A. & MITCHELL, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 434–456.
- ZANARDO, R.C.O., COSTA, E., FERREIRA, H.H.A., ANTUNES, E., MARTINS, A.R., MURAD, F. & DE NUCCI, G. (1997). Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 14111–14114.

(Received November 20, 2003  
Accepted December 10, 2003)