

Ana Carolina de Almeida

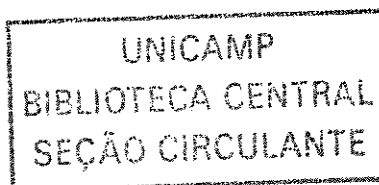
"Regulação do Sistema NADPH Oxidase de Macrófagos do Colostro Humano"

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

Campinas, 20 de fevereiro de 2003.


Prof. Dr. Antonio Condino Neto
- Orientador -

Campinas, 2003



Ana Carolina de Almeida

**"Regulação do Sistema NADPH Oxidase
de Macrófagos do Colostro Humano"**

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.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto
Campinas, 2003

200404938

IDADE BC
CHAMADA I/UNICAMP
AL64r
EX
MBO BC/ 57385
CC 16-117 - 04
D X
ECO 11,00
DA
CPD

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

CM00196151-7

BIBID. 354848

Al64r

Almeida, Ana Carolina de
“Regulação do sistema NADPH oxidase de macrófagos do colostro humano” / Ana Carolina de Almeida. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

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

1. Superóxido. 2. Expressão genética. 3. Monócitos. 4.
Aleitamento materno. 5. Interferon. 6. Fator de necrose de tumor. I.
Antonio Condino Neto. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Membros:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Profa. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob

Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

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

Data: 20/02/2003

AGRADECIMENTOS

Às mães, que me surpreenderam com sua prontidão em doar as amostras de sangue e colostro;

Ao Dr. Antonio Condino Neto, pela confiança e paciência durante essa aprendizagem;

Ao Dr. José Martins Filho, por ter despertado em mim a paixão pelo estudo do aleitamento materno;

À Enfermeira Silvana Dalgè Severino, pelas coletas de sangue e colostro, e sobretudo pela amizade;

À Jussara Rehder, pelo apoio no trabalho em bancada;

Às Enfermeiras do Alojamento Conjunto do Caism, sempre dispostas a ajudar;

Ao Pessoal do laboratório: Juan, Livia, Mônica, Piedad, Carolina, Péricles, Lina, Concilia, Marcos, Patrícia, Edgar, Yara, D. Maria Helena, pela ajuda e por tornarem esse trabalho ainda mais prazeroso;

À Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, pelo uso do aparelho Elisa;

Ao pessoal da administração do CIPED: Maria do Rosário, Madalena, Pedretti, Milton, Sandrinha, Simone, por cuidarem tão bem de toda a burocracia;

Ao secretário Wanderley Cunha Claro, por toda a orientação.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

E a todos os meus amigos “de fora”, que agüentaram firmes meus dias de mau-humor e ansiedade, a minha ausência por causa dos estudos. Que me encorajaram nos momentos de desânimo, e vibraram comigo em cada conquista.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marisa e Humberto, e à minha irmã Camila, pelo apoio incondicional, pelo carinho e compreensão. É impossível definir com palavras o quanto eles são importantes na minha vida, em cada passinho meu.

Índice

	Pág.
Lista de Tabelas.....	XV
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XVII
1. Resumo.....	XXI
2. Introdução.....	24
2.1 O Sistema NADPH oxidase.....	25
2.2 Interferon- γ e Fator de Necrose Tumoral- α	29
2.3 Monócitos e Macrófagos.....	31
2.4 Neonato e Aleitamento.....	32
2.5 Macrófagos do Colostro.....	36
3. Justificativa e Objetivos.....	39
3.1 Justificativa.....	40
3.2 Objetivos Gerais.....	40
3.3 Objetivos Específicos.....	41
4. Materiais e Métodos.....	42
4.1 Seleção de Puérperas.....	43
4.2 Coleta de Amostras de Sangue e Colostro.....	43
4.3 Cultura e obtenção de monócitos/macrófagos e células THP-1.....	43
4.4 Tratamento Farmacológico.....	44
4.5 Determinação da Atividade NADPH oxidase.....	44
4.6 Obtenção de RNA.....	45
4.7 Transcrição Reversa.....	46
4.8 Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	46
4.9 Eletroforese.....	47
4.10 Análise da densitometria das bandas.....	47
4.11 Análise Estatística.....	47
5. Resultados.....	48
6. Discussão.....	68
6.1 Estudos Bioquímicos.....	69
6.2 Expressão Gênica.....	72

7. Conclusões.....	78
8. Summary.....	80
9. Referências Bibliográficas.....	83
10. Anexo.....	95

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela I: Liberação espontânea e estimulada (com 30 nM de PMA) de superóxido (nmol de superóxido / 10^6 células / 60 minutos) por macrófagos do colostro, monócitos do sangue periférico e células THP-1 cultivadas por 48 horas em condições basais (controle), ou com 100 U/ml de IFN- γ isolado ou associado a 1000 U/ml de TNF- α	50
Tabela II: Expressão relativa do gene gp91phox (em relação ao gene de expressão constitutiva 18S) de macrófagos do colostro, monócitos de sangue periférico e células THP-1 cultivados em condições basais (controle) ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α	62

Lista de Abreviaturas e Símbolos

BID-1, -2, e -3	“Binding Increased During Differentiation”
C/EBP α	“CCAAT Enhancer Binding Protein α ”
C2	fragmento 2 do complemento
C3	fragmento 3 do complemento
C4	fragmento 4 do complemento
CD16	“cluster of differentiation” 16
CD23	“cluster of differentiation” 23
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CO ₂	gás carbônico
CSF-1	“colony-stimulating factor-1”
DNA	ácido desoxirribonucléico
FAD	“flavin adenine dinucleotide”
fMLP	N-formil-Met-Leu-Phe
GDI	inibidor de dissociação
GM-CSF	fator de crescimento de colônia de granulócitos e monócitos
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAF-1	“Hematopoietic-Associated Factor”
HMP	hexose monofosfato
HOCl	ácido hipocloroso
IFN- γ	interferon- γ
IFN- α/β	interferon- α e β
IgA	imunoglobulina A
IgAs	imunoglobulina A secretória
IL-1 β	interleucina-1 β
IL-10	interleucina-10
IL-13	interleucina-13
IL-1RA	interleucina-1RA
IL-3	interleucina-3
IL-4	interleucina-4

IL-6.....	interleucina-6
IL-8.....	interleucina-8
kb.....	quilobase
LIF.....	“leukaemia inhibitory factor”
LPS.....	lipopolissacarídeo
LTB4.....	leucotrieno B4
LTC4.....	leucotrieno C4
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MHC.....	complexo de histocompatibilidade principal
NADPH.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT.....	“nitro blue tetrazolium”
nt.....	nucleotídeo
O ₂ ⁻	ânion superóxido
O ₂	oxigênio molecular
PCR.....	reação de polimerização em cadeia
PKC.....	proteína quinase C
PMA.....	forbol 12-miristato 13-acetato
RNA.....	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
rpm.....	rotações por minuto
RPMI.....	meio rico para cultura de células de mamíferos originalmente desenvolvido no “Roswell Park Memorial Institute”
RT.....	transcriptase reversa
SOD.....	superóxido dismutase
TGF-β.....	fator de crescimento tumoral-β
TGF-α.....	fator de crescimento tumoral-α
TNF-α.....	fator de necrose tumoral-α

1. RESUMO

Os fagócitos, dentre eles, macrófagos, granulócitos e eosinófilos contêm uma NADPH oxidase associada à membrana, a qual produz superóxido e outros intermediários do oxigênio, os quais têm importante papel na defesa contra infecções. O colostro humano, além de suas propriedades nutricionais, é considerado uma importante fonte de fatores imunoprotetores para os neonatos. Os macrófagos do colostro constituem parte destes fatores imunoprotetores. O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade do sistema NADPH oxidase e a expressão do gene *CYBB*, que codifica a glicoproteína gp91-*phox*, em macrófagos do colostro humano, e compará-las às de monócitos do sangue periférico e células mielomonocíticas humanas THP-1. Tais células foram cultivadas com IFN- γ e TNF- α durante 48 horas. A seguir, a liberação de superóxido foi determinada espectrofotometricamente por meio da redução do citocromo c especificamente inibida pela superóxido dismutase. A expressão do gene *CYBB*, que codifica o componente gp91-*phox*, foi determinada por meio de RT-PCR quantitativo-relativo. Nossos resultados mostram que a liberação espontânea de superóxido por macrófagos do colostro foi superior à de monócitos do sangue periférico. Contudo, ao serem estimulados com PMA e as citocinas IFN- γ e TNF- α , macrófagos de colostro e monócitos do sangue periférico apresentam atividade NADPH oxidase equivalente. A liberação de superóxido por macrófagos do colostro e monócitos do sangue periférico foi sempre superior à de células THP-1, mesmo sendo estas, estimuladas com PMA e as citocinas IFN- γ e TNF- α . Tais citocinas aumentaram a expressão relativa do gene gp91-*phox* em células THP-1, mas não em monócitos de sangue periférico e em macrófagos do colostro. Desta forma, após a cultura com as citocinas, as células THP-1 passaram a apresentar expressão relativa do gene gp91-*phox* semelhante às outras duas populações, sem contudo, apresentar atividade NADPH oxidase equivalente, demonstrando que a atividade NADPH oxidase final na linhagem mielomonocítica humana é regulada em parte pela expressão do gene *CYBB*, é o produto de diferentes eventos do metabolismo celular e está relacionada ao estado de diferenciação celular.

2. INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

2.1. O Sistema NADPH Oxidase

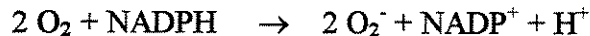
Os fagócitos profissionais, como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos apresentam um fenômeno metabólico definido como "explosão respiratória" em resposta a estímulos inflamatórios ou infecção. Os reativos intermediários do oxigênio liberados, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, são microbicidas, mas ao mesmo tempo tóxicos ao tecido circundante, indicando os importantes papéis dessa função, na defesa do hospedeiro e na reação inflamatória (para revisão, Bastian & Hibbs, 1994; Abdalla, 2001). Apesar de suas propriedades destrutivas, o superóxido e os radicais livres a ele relacionados, também podem estar envolvidos na mediação da diferenciação celular, ativação (Yang et al., 2000) e proliferação (Sauer et al., 2001), o que pode explicar a geração dessas substâncias também por fibroblastos (Meier et al., 1989), linfócitos B, células endoteliais (Yang et al., 2000) e plaquetas (Seno et al., 2001). O modo de ação dos reativos intermediários do oxigênio pode envolver a interação direta com receptores específicos e/ou a ativação redox das vias de sinalização como as proteína-quinases, proteína-fosfatases e fatores de transcrição (para revisão, Sauer et al., 2001; Forman & Torres, 2002; Heerebeek et al., 2002).

A liberação de reativos intermediários do oxigênio por fagócitos, resulta da montagem e ativação do sistema NADPH oxidase (nicotinamida dinucleotídeo fosfato oxidase – forma reduzida), uma enzima multicomponente que catalisa a doação de um elétron ao oxigênio molecular transformando-o em superóxido (Rossi & Zatti, 1964; para revisão, Abdalla, 2001; Leusen et al., 1996). O conhecimento sobre os componentes do sistema NADPH oxidase, seus genes e suas relações estruturais, avançou dramaticamente nos últimos 15 anos. Seus componentes protéicos individuais e seus genes foram clonados (Royer-pokora et al., 1986; Volpp et al., 1988; Nunoi et al., 1988; Leto et al., 1990; Dinauer et al., 1990). O estudo da estrutura de suas proteínas e suas interações com a membrana celular, permitiram propor um modelo de sua organização e associação durante a ativação dos fagócitos (Parkos et al., 1988; Jesaitis et al., 1990).

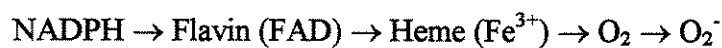
O sistema NADPH oxidase pode ser rapidamente ativado por uma variedade de estímulos associados com as funções fagocíticas (para revisão, Leusen et al., 1996; Segal &

Shatwell, 1997). *In vitro*, estes estímulos dependem ou não da interação específica com receptores. Os estímulos receptor-dependentes típicos são o fragmento C5a do complemento, o tripeptídeo quimiotático N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP) e imunocomplexos. Já os estímulos receptor-independentes incluem ácidos graxos insaturados de cadeia longa e PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) (para revisão, Abdalla, 2001; Leusen et al., 1996). O PMA é um componente solúvel que ultrapassa a membrana do fagócito e ativa diretamente a proteína quinase C (PKC) (Mouithys-Mickalad et al., 2001), a qual provoca a fosforilação do p47phox e o consequente acoplamento dos fatores citosólicos da NADPH oxidase ao flavocitocromo b₅₅₈ na membrana celular, levando à ativação da enzima e à produção de ânion superóxido pela redução univalente do O₂ (Wang et al., 1997).

Esse sistema enzimático responsável pela produção de superóxido forma um sistema de transporte de elétrons transmembrana que resulta na oxidação do NADPH na superfície citoplasmática e na geração de superóxido na superfície externa da membrana (para revisão, Babior, 1984), expresso na seguinte reação (para revisão, Abdalla, 2001; Leusen et al., 1996):



A NADPH oxidase retira elétrons do NADPH e os transporta via FAD (“flavin adenine dinucleotide”) e heme ao oxigênio molecular (para revisão, Abdalla, 2001; Segal & Shatwell, 1997).



O doador terminal de elétrons para o oxigênio é um flavocitocromo b (citocromo b₅₅₈), localizado primariamente na membrana plasmática, sendo encontrado também nos grânulos secundários e gelatinase (Kjeldsen et al., 1993) e, em menor escala, nas vesículas secretoras.

O superóxido produzido, é na sequência convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido hipocloroso (HOCl) e outros produtos microbicidas (para revisão, Abdalla, 2001; Leusen et al., 1996; Halliwell, 1995).

O citocromo b₅₅₈ é um heterodímero composto de uma glicoproteína de 91 kDa (gp91-phox) e um polipeptídeo de 22 kDa (p22-phox). Está associado a uma proteína chamada Rap1A, quando ocorre a ativação da NADPH oxidase (para revisão, Bastian &

Hibbs, 1994; Leusen et al., 1996). Além do heterodímero citocromo b, quatro fatores citosólicos (p47-phox, p67-phox, p40-phox e p21Rac) são necessários para a atividade da NADPH oxidase (para revisão, Bastian & Hibbs, 1994; Lacy et al., 1999).

Yagisawa et al. (Yagisawa et al., 1996) mostraram que o conteúdo das proteínas p22-phox, p47-phox e p67-phox é diretamente proporcional à atividade da enzima NADPH oxidase estimulada com PMA, que mostrou ser maior em eosinófilos que em neutrófilos, seguidos de monócitos e macrófagos alveolares, os quais apresentaram valores equivalentes. Já a proteína gp91-phox mostrou-se não ser um fator dose-limitante para a atividade da explosão respiratória, pois de acordo com os resultados de Yagisawa, maior quantidade dessa proteína é encontrada em macrófagos, seguidos de neutrófilos e eosinófilos, os quais apresentam a mesma concentração que os monócitos.

Os estudos sobre a especificidade tecidual e expressão dos genes que codificam as duas cadeias do flavocitocromo b, revelaram que o gene *CYBB* que codifica a gp91-phox se expressa predominantemente nos fagócitos, e o gene *p22-phox* se expressa constitutivamente em várias linhagens celulares (Royer-pokora et al., 1986; Parkos et al., 1988).

A gp91-phox é uma proteína altamente glicosilada e contém locais de ligação para FAD e NADPH (para revisão, Bastian & Hibbs, 1994; Segal & Shatwell, 1997). Essa proteína contém 570 aminoácidos, com quatro ou cinco hélices transmembrana e cinco potenciais locais de glicosilação "N-linked" na região amino-terminal. Mutações no gene que codifica a gp91-phox são responsáveis pelos casos de doença granulomatosa crônica ligada ao cromossomo X, que é a forma mais comum desta doença (cerca de 60% dos casos). Defeitos no componente citosólico p47-phox respondem pela maioria dos casos de doença granulomatosa crônica autossômica recessiva (cerca de 30% dos casos). Defeitos nos componentes p67-phox e p22-phox são de ocorrência mais rara (cerca de 10% dos casos). Defeitos no componente p40-phox ainda não foram relatados. (Volpp et al., 1988; para revisão, Leusen et al., 1996; Roos et al., 1996; Cross et al., 1996).

O gene *gp91-phox*, motivo de nossa atividade de pesquisa, foi mapeado no braço curto do cromossomo X, no segmento Xp21.1 (Baehner et al., 1986), ocupa aproximadamente 30kb do DNA genômico e contém 13 exons, os quais variam de 0,7 a 7 kb em tamanho (Skalnik et al., 1991). A análise estrutural da região de 1,5 kb proximal ao

flanco 5'terminal, revelou uma caixa CCAAT duplicada entre -106 e -124 nt (numeração proximal ao sítio de início de transcrição), bem como uma caixa TATA não consensual em -30 nt (Skalnik et al., 1991). O promotor do gene *gp91-phox* não tem homologia com o promotor de outros genes mielóides, como elastase do neutrófilo (Srikanth & Rado, 1994), catepsina G (Heusel et al., 1991), receptor para o fator de crescimento de colônias de granulócitos (G-CSF) (Smith et al., 1996), ou sítios de consenso para a ligação de fatores transcricionais associados a expressão gênica da linhagem mielomonocítica, como C/EBP α ou PU.1 (Smith et al., 1996; Scott et al., 1994). Há um elemento com sequência consensual de resposta ao IFN- γ , mas não para o fator de necrose tumoral (TNF- α).

A análise funcional do promotor do gene *gp91-phox* demonstrou vários elementos regulatórios positivos e um repressor, que modulam sua atividade transcricional. Estudos sobre duas famílias com doença granulomatosa crônica, revelaram que mutações pontuais (-55 ou -57 nt), reduziram dramaticamente a atividade transcricional do gene *gp91-phox* na maioria dos fagócitos, exceto numa pequena subpopulação de células com função essencialmente normal (Newburger et al., 1994; Woodman et al., 1995). Tais mutações impediam a ligação de uma proteína detectada em experimentos "gel shift", e posteriormente caracterizada como um novo elemento regulatório transcricional, denominado HAF-1 ("Hematopoietic-Associated Factor"), restrito às células hematopoiéticas e necessário, mas não suficiente, para a indução do gene *gp91-phox* pelo IFN- γ (Eklund et al., 1995). Estudos adicionais (Eklund et al., 1996), demonstraram três elementos entre -450 e -100 nt no promotor do gene *gp91-phox* com atividade ligante, denominados BID-1, -2, e -3 ("Binding Increased During Differentiation"). Um elemento transcricional repressor foi inicialmente identificado como uma interferência na atividade ligante da CP1, causada por um grande complexo de DNA-proteína, em experimentos "gel shift", usando extratos nucleares de células que não expressam o gene *gp91-phox*, como células não mielóides ou células HL-60 indiferenciadas (Skalnik et al., 1991). O repressor foi identificado como uma proteína que desloca o elemento CCAAT, um repressor transcricional amplamente distribuído (Superti-fuga et al., 1989). Estudos posteriores demonstraram quatro sítios ligantes para a proteína que desloca o elemento CCAAT, cada um inibindo a ligação e ativação transcricional de CP1 ou um dos fatores BID (Luo &

Skalnik, 1996). Tais estudos contribuíram para o avanço do conhecimento fundamental dos mecanismos transcricionais na linhagem mielomonocítica humana.

Após ativação celular, ocorre fosforilação da p47-phox (para revisão, Leusen et al., 1996) em nove resíduos de serina na sequência C-terminal, em particular nos resíduos 303 e 304 (el Benna et al., 1994), e a exposição dos domínios SH3 desta proteína, que interagem com as regiões ricas em prolina da p22-phox (Lee et al., 2000). Duas proteínas G de baixo peso molecular se integram ao sistema NADPH oxidase fagocítico: a proteína p21Rac (Kim and Dinanuer, 2001) que normalmente se encontra complexada no citosol com GDI (inibidor de dissociação), se dissocia desse complexo e interage com a p67-phox, o que é essencial para a interação dessa proteína com o citocromo b_{558} ; e a rap1 se associa ao componente p22-phox na membrana (Quinn et al., 1989). Estas proteínas contribuem para a estabilização do complexo enzimático e regulam sua atividade biológica (Gabig et al., 1995; Knauss et al., 1995). Em seguida ocorre a translocação desses componentes citosólicos para a membrana e a interação destes com o citocromo b_{558} (Abdalla, 2001; Leusen et al., 1996). A interação das proteínas citosólicas com o citocromo b_{558} causa uma alteração conformacional nas subunidades do flavocitocromo que leva ao transporte de elétrons (Segal & Shatwell, 1997; Quinn et al., 1989; Abo et al., 1994). Um novo componente citosólico foi identificado e clonado. Trata-se da proteína p40-phox, a qual se associa à p67-phox (Wientjes et al., 1993; Zhan et al., 1996). Seu papel na atividade do sistema NADPH oxidase ainda não foi totalmente esclarecido (Anexo).

Yang et al. (Yang et al., 2000) mostraram que as tirosina quinases desempenham um importante papel na regulação da translocação dos componentes da NADPH oxidase do local da síntese para a superfície celular.

Em fagócitos, o nível de atividade da NADPH oxidase alcançado após a ativação celular é modulada por prévio tratamento com agentes moduladores, incluindo lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e uma variedade de citocinas, tais como IFN- γ e TNF- α (Newburger et al., 1991; Condino-Neto et al., 1998).

2.2. Interferon- γ e Fator de Necrose Tumoral- α

O interferon-gama (IFN- γ), é uma citocina produzida por macrófagos, células natural killer e linfócitos, que atua na resposta inflamatória potencializando a apresentação

de antígenos e a liberação de citocinas inflamatórias (Badie et al., 2000), e aumenta a liberação por fagócitos, de produtos como reativos intermediários do oxigênio e óxido nítrico, que desempenham um importante papel na atividade antimicrobiana dessas células (Condino-Neto et al., 1998; Cassatella et al., 1985; Cassatella et al., 1990; Gessani & Belardelli, 1998; Bar-Or, 2000). O IFN- γ exerce suas funções através da ligação a receptores específicos da superfície celular, ativação de moléculas sinalizadoras de transdução, e a consequente modulação da expressão gênica (Ossina et al., 1997).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que tem como principal fonte o macrófago ativado (Chensue et al., 1988), apresenta funções imunomodulatórias (Schulze-Osthoff et al., 1992) e pró-inflamatórias (Beyaert & Fiers, 1994; Azzawi & Hasleton, 1999), sendo que uma delas é ativar a produção de espécies reativas do oxigênio (Liu et al., 2000), exercendo porém um efeito sinérgico quando associado ao IFN- γ (Newburger et al., 1991; Condino-Neto et al., 1998; Cassatella et al., 1985). Além disso, o IFN- γ estimula a expressão dos receptores de TNF- α em muitos tipos de células, o que pode ser responsável em parte por esse sinergismo (Paul, 1999).

O TNF- α exerce seu efeito por meio da ligação e agrupamento a receptores específicos de alta afinidade que estão presentes na membrana plasmática de quase todas as linhagens celulares, ocasionando a síntese de citocinas e a geração de ânion superóxido (para revisão, Meier et al., 1989; Beyaert & Fiers, 1994; Heller & Kronke, 1994).

Newburger et al. (Newburger et al., 1991) mostraram que macrófagos e granulócitos respondem à incubação com IFN- γ com o aumento da expressão da cadeia pesada do citocromo b, aproximadamente 12 e 4 vezes, respectivamente, o que está de acordo com o encontrado por Cassatella et al. (Cassatella et al., 1990). Em experimentos com células monocíticas humanas THP-1, Condino-Neto et al. (Condino-Neto et al., 1998) mostraram que a cultura com IFN- γ e o TNF- α , de maneira isolada ou em associação induzem as células mielomonocíticas THP-1 a se diferenciar e expressar atividade NADPH oxidase, citocromo b₅₅₈, e a transcrição dos genes que codificam os componentes gp91-phox e p47-phox da NADPH oxidase.

Além disso, Dusi et al. (Dusi et al., 2001) mostraram que a cultura de monócitos humanos com IFN- γ ou TNF- α provoca um aumento na produção de

superóxido, o que é acompanhado pelo aumento paralelo da expressão de gp91-phox, p22-phox e p47-phox, enquanto a expressão de p67-phox e p40-phox se mantém inalterada.

2.3. Monócitos e Macrófagos

O sistema fagocítico mononuclear é formado por células que são de uma linhagem comum e apresentam como função primária a fagocitose. Essas células se originam na medula óssea (células tronco → monoblastos), circulam no sangue (monócitos), e se tornam maduras e ativadas em vários tecidos (macrófagos). São definidas como macrófagos no tecido conjuntivo, células microgliais no sistema nervoso central, células reticulares nos órgãos linfóides, osteoclastos no tecido ósseo, células de Kupfer no fígado, e macrófago alveolar no pulmão (Abbas et al., 2000).

Monócitos são descritos como precursores de macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos, e apresentam uma grande capacidade de geração de ânion superóxido, o que demonstra seu forte potencial microbicida (Pabst et al., 1982).

Os monócitos do sangue dão origem a macrófagos terminalmente diferenciados, que não podem mais recircular ou reiniciar replicação de DNA, a não ser de uma forma limitada. Além disso, essas células têm longa vida e mantêm a habilidade de sintetizar RNA e proteínas em grande proporção, mesmo quando se encontram em um estado relativamente quiescente, como células residentes (Paul, 1999).

A ativação de macrófagos envolve ainda alterações complexas na morfologia, metabolismo e função. Aumento da morte microbiana, a característica definitiva de ativação, inclui alterações não só na atividade NADPH oxidase, mas também na cinética da opsonização e ingestão mediada por receptores (Newburger et al., 1991).

No organismo, o crescimento e diferenciação dos macrófagos são estreitamente regulados por fatores de crescimento específicos, como IL-3, CSF-1, GM-CSF, IL-4 e IL-13, e inibidores, como IFN- α/β , TGF- β e LIF (leukemia inhibitory factor), que variam consideravelmente na sua potência e seletividade (Paul, 1999). Já a combinação de citocinas, *in vitro*, apresenta efeitos diferentes nos macrófagos em relação à soma das partes (Newburger et al., 1991). A resposta de crescimento das células monocíticas a um estímulo extrínseco, diminui progressivamente e de forma marcante durante a diferenciação de células-tronco até o precursor de monoblastos, monócitos e macrófagos. (Paul, 1999).

2.4. Neonato e Aleitamento

O processo de desenvolvimento do sistema imune na criança se inicia na vida embrionária e fetal e continua até a adolescência, quando atinge amadurecimento semelhante ao do indivíduo adulto. Esta ontogenia repete a filogenia com respeito à sequência evolucionária de aparecimento das classes de imunoglobulinas. IgM é a classe predominante nos vertebrados mais primitivos e a primeira a ser produzida em humanos; IgG é a segunda classe elaborada durante a ontogenia; o sistema de anticorpos IgA aparece como evento evolucionário restrito aos mamíferos e tem relevância na defesa das superfícies mucosas contra a aderência e penetração de inúmeros patógenos (para revisão, Grumach, 2001).

A falta de exposição prévia aos antígenos determina que seja lento o desenvolvimento extra-uterino de muitos componentes do sistema imune humano. O recém-nascido e o lactente possuem menor capacidade de responder aos antígenos do que as crianças mais velhas e os adultos.

As infecções invasivas por vírus e bactérias encapsuladas tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae b* e *Neisseria meningitidis*, ocorrem com maior frequência em lactentes. A susceptibilidade a tais infecções aumenta com o grau de prematuridade.

Para enfrentar esta imaturidade fisiológica, a placenta realiza a transferência passiva de IgG durante a gestação, e o leite materno, a transferência passiva de IgA, sendo o único alimento capaz de realizar a suplementação imunológica do lactente. Examinar este processo de interação entre o desenvolvimento do sistema imune e a susceptibilidade às infecções constitui uma tarefa prioritária para o pediatra.

O sistema imune inato é constituído por células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e de Langerhans), fagócitos profissionais (neutrófilos, monócitos e macrófagos), e células mediadoras da inflamação (mastócitos, eosinófilos e basófilos).

Na fase inicial da infecção os neutrófilos, monócitos e macrófagos ligam-se aos microorganismos, os internalizam e destroem. Este processo desencadeia elevado suprimento sanguíneo, aumento da permeabilidade capilar e migração de leucócitos.

Os neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes aderem e migram para os tecidos através do endotélio dos capilares. Esta migração é controlada pela interação entre os ligantes da superfície dos leucócitos (adesinas: selectinas e β 2-integrinas) e os receptores correspondentes no endotélio ativado. Nos tecidos estas células realizam quimiotaxia, reconhecimento inespecífico do antígeno, fagocitose e atividade microbicida, mediando, deste modo, a resposta imune inata.

No recém-nascido os neutrófilos ativados apresentam deficiência na expressão das integrinas e L-selectinas (β 2 integrinas CD11a , CD11b, CD11c, CD18) e na reorganização de estruturas do citoesqueleto, após ligação dos fatores quimiotáticos do soro aos receptores de membrana celular. Conseqüentemente, a adesão dos neutrófilos ao endotélio é reduzida para 40%-45% daquela observada em adultos. A migração também está diminuída e a quimiotaxia deficiente é o defeito mais consistente. A baixa concentração dos fatores quimiotáticos no soro contribui para estas deficiências e, aos 5 anos de idade, a quimiotaxia alcança a competência do adulto.

O feto e o recém-nascido possuem baixa capacidade de acelerar a produção de neutrófilos em resposta à infecção. Aparentemente, isto ocorre porque o “pool” de precursores de neutrófilos armazenado é menor do que em adultos, e a taxa de proliferação é próxima do nível máximo. O número de unidades formadoras de colônia granulócito/macrófago (CFU-GM) é 10 a 20 vezes mais elevado do que em adultos. Além disso, particularmente em prematuros, a fração de precursores de granulócitos é menor do que a de monócitos podendo ser um fator de susceptibilidade à infecção neonatal.

As atividades fagocítica e microbicida *in vitro* dos neutrófilos de recém-nascido são normais ou discretamente menores do que em adultos. O número de receptores Fc para IgG e para C3b (CR1) nos neutrófilos de neonatos é similar ao de adultos. A taxa de geração de ânion de superóxido em fetos, neonatos e adultos é semelhante e, a de radical hidroxila está diminuída. Os mecanismos microbicidas independentes do oxigênio não estão bem caracterizados. A liberação de lisozima e α -glicuronidase dos lisossomos parece estar intacta. O conteúdo dos grânulos específicos está reduzido e é possível que estes neutrófilos possuam baixa quantidade de defensinas.

Neutrófilos maduros aparecem no feto de 14 a 16 semanas e correspondem a menos de 10% dos leucócitos circulantes com 22 a 24 semanas, 50-60% no fim da gestação, elevando-se significativamente após o nascimento.

Os fagócitos mononucleares pertencem ao grupo de células de vida longa. Os monócitos são derivados dos precursores mielóides da medula óssea e precursores dos macrófagos nos tecidos. Esta diferenciação dos monócitos em macrófagos resulta que, 95% são macrófagos de tecidos e menos que 2% são monócitos. Os macrófagos são os primeiros elementos detectáveis do sistema imune. São encontrados na quarta semana de gestação, no saco vitelino, posteriormente no fígado fetal e medula óssea. Os monócitos CD14+ que migram para os tecidos tornam-se residentes e se diferenciam em macrófagos, perdendo CD14+ por meio de um mecanismo desconhecido.

Em recém-nascidos, a produção de monócitos, a quantidade de moléculas MHC classe II e a produção de citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α são similares às das do adulto. Entretanto, é lenta a liberação destas células para o local da infecção. Os macrófagos residentes no baço e fígado são escassos e funcionalmente ineficientes.

Enquanto a meia-vida dos granulócitos é de aproximadamente 7 horas, a dos monócitos é de 70 horas e, a dos macrófagos, é de 60 dias a muitos anos. A contagem absoluta dos monócitos no sangue periférico varia de 1100/mm³ durante as primeiras duas semanas de vida (monocitose relativa) até 350/mm³ a 700/mm³ durante o resto da infância.

Os monócitos neonatais processam e apresentam antígeno para as células T e B, possuem atividade de citotoxicidade na presença de anticorpo, respondem ao IFN- γ , inibindo a multiplicação de vírus e destruindo patógenos intracelulares.

Em resumo, as deficiências no sistema dos fagócitos em neonatos incluem: diminuição do “pool” de neutrófilos armazenado e diminuição na capacidade de resposta a estímulo quimiotático. A redução da fagocitose e da atividade microbicida é menos significativa, mas a baixa produção de anticorpos e complemento contribui para intensificar esta deficiência.

Os monócitos de neonatos a termo são normais em número e tão competentes quanto aqueles de adultos, no que diz respeito às atividades microbicida e de fagocitose. A atividade quimiotática está comprometida e pode causar diminuição do influxo destas células para os locais de inflamação, como na hipersensibilidade retardada.

A atividade microbicida e de fagocitose nos macrófagos nos recém-nascidos, bem como a apresentação do antígeno está imatura. A produção de TNF- α e IL-6 está reduzida, particularmente em neonatos pré-termo, devido à baixa produção de IFN- γ pelas células T e à falta de cooperação entre T e monócitos/macrófagos. Em consequência, a infecção por patógenos intracelulares é mais freqüente e mais grave nesta idade (para revisão, Grumach, 2001).

O leite humano é uma suspensão de células viáveis, sendo que os macrófagos são as células mais abundantes, compreendendo 40-80% do total. Pouco se sabe sobre o papel imunoprotetor dos fagócitos do colostro no intestino de recém-nascidos (Honorio-Franca et al., 1997).

O leite materno é o alimento mais importante, balanceado e completo a ser oferecido aos lactentes nos primeiros meses de vida (Martins-Filho, 1987). Esse alimento não apenas fornece nutrição ao recém-nascido, como também confere imunidade passiva, protegendo contra doenças gastrointestinais e respiratórias. Além disso, o leite materno pode ter a capacidade de estimular diretamente as funções imunes e proteger contra doenças auto-imunes (Srivastava et al., 1996). Fagócitos (macrófagos e polimorfonucleares), linfócitos, fatores imunomoduladores (como lactoferrina, IL-10, TGF- β), citocinas, fatores antimicrobianos (IgA secretória, carboidratos, glicoproteínas, glicolipídeos, glicosaminoglicanos, mucinas, oligossacarídeos) e probióticos fazem com que o colostro e leite materno desempenhem um papel fundamental na proteção ao recém-nascido (Ogra & Greene, 1982; Goldman, 1993; Newman, 1995; Kelly & Coutts, 2000). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , embora em pequenas quantidades (Srivastava et al., 1996), coexistem no leite humano com citocinas que promovem a tolerância imunológica, como a IL-1RA e IL-10 (Srivastava et al., 1996; Pabst, 1997). Além disso, o leite humano contém uma grande quantidade de M-CSF, um importante fator de crescimento para macrófagos (Srivastava et al., 1996). Nakajima et al. (Nakajima et al., 1977) mostraram que o colostro humano contém todos os componentes do sistema complemento, que pode ser ativado tanto pela via clássica por anticorpos, quanto pela via alternativa por bacilos gram-negativos como *Escherichia coli* sem a participação de anticorpos.

Já outros leucócitos normalmente associados à inflamação, como basófilos, mastócitos, eosinófilos e plaquetas, não são encontrados no leite humano. Os leucócitos do leite humano se originam do sangue, sendo que a migração dessas células provavelmente se deve em parte pelos hormônios produzidos no final da gravidez e durante a lactação (Goldman & Goldblum, 1997).

Um estudo feito por Pitt (Pitt et al., 1977) mostrou que uma parte dos leucócitos ingeridos permanece viável no trato gastrointestinal de ratos por mais de uma semana, sendo possível que eles continuem ativos no local durante esse período, fornecendo proteção passiva contra a invasão bacteriana sistêmica.

O leite humano é uma importante fonte de macrófagos não desafiados antigenicamente. As funções biossintéticas desses macrófagos podem ser comparadas com funções similares de macrófagos humanos de outros locais, tais como macrófagos broncoalveolares e gastrointestinais, o que torna o colostro e o leite humanos importantes fontes dessa população celular (Cole et al., 1982; Balkwill & Hogg, 1979), ainda mais se considerarmos a dificuldade de se obter esse tipo de células de humanos (Vassao & Carneiro-Sampaio, 1989).

2.5. Macrófagos do Colostro

Os macrófagos de colostro humano são células monocíticas maduras, que desempenham um papel na proteção à lactante, combatendo a mastite (Balkwill & Hogg, 1979; Outteridge & Lee, 1981), e ao neonato, pois, além da fagocitose, sintetizam fatores de defesa humoral incluindo componentes do complemento (Fator B, C2, C3 e C4) (Cole et al., 1982; Goldman et al., 1986), lactoferrina, lisozima (Vassao & Carneiro-Sampaio, 1989; para revisão, Goldman & Goldblum, 1997), LTB₄, LTC₄ (Shimizu et al., 1993), TGF- α (Wagner et al., 1995) e prostaglandina E₂ (Blau et al., 1983). Representam 30 a 80% de uma população de leucócitos do colostro humano que pode variar de 500 a 10.000 células/ml (Goldman & Goldblum, 1997). O número de células no colostro humano apresenta grande variação (Crago et al., 1979).

Essas células expressam moléculas do MHC de classe II (Leyva-Cobian & Clemente, 1984), desenvolvem citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Mandyla et al., 1982; Kohl, 1980), fagocitam bactérias e outras partículas normalmente (Speer et al.,

1986), apresentam morfologia e motilidade de células ativadas (Babior, 1984; para revisão, Goldman & Goldblum, 1997), e têm a habilidade de aderir ao vidro (Balkwill & Hogg, 1979).

De acordo com os resultados obtidos por Clemente et al. (Clemente et al., 1986a), essa população celular apresenta resposta quimiotática diminuída, o que pode ser devido ao fato de essas serem células maduras terminais, ou por estarem carregadas de lipídios fagocitados em seu citoplasma. Essa última hipótese é confirmada pelo fato de que nesse mesmo estudo, quando monócitos de sangue periférico foram pré-incubados com sobrenadante de leite humano e depois testados para quimiotaxia, estes também ingeriram lipídios e proteínas, e apresentaram resposta quimiotática reduzida.

Os macrófagos de colostro também carregam IgA secretória em seu citoplasma (para revisão, Goldman & Goldblum, 1997), dentro de vacúolos (Clemente et al., 1986b), liberando-a com o tempo e durante a fagocitose, o que faz com que os microorganismos específicos a essa imunoglobulina não possam aderir e colonizar o trato gastrointestinal do neonato (Crago et al., 1979; Weaver et al., 1982; Pittard et al., 1977). A opsonização de *Escherichia coli enteropatogenica* (EPEC) pela IgA presente no sobrenadante do colostro é fundamental para atividade microbicida dos fagócitos mononucleares do colostro (Honorio-Franca et al., 1997).

Johnson et al. (Johnson et al., 1980) mostraram que os macrófagos do colostro humano apresentam maior atividade hexose monofosfato, que tem como uma de suas principais funções a geração de NADPH (que fornecerá os equivalentes redutores durante a explosão respiratória), e maior atividade metabólica, o que foi evidenciado pelos testes de redução do Nitro Blue Tetrazolium (NBT) e de morte de bactérias. O fato de os fagócitos do colostro gerarem uma resposta de quimioluminescência muito baixa foi atribuído à grande quantidade de glóbulos de gordura que essas células carregam em seu citoplasma, e que acabam por interferir na reação luminosa.

Speer et al. (Speer et al., 1986) mostraram que macrófagos do colostro recém isolados produzem superóxido e H_2O_2 quase nas mesmas proporções que monócitos de sangue periférico, após estímulo com PMA. Além disso, também mostraram que essas células, quando cultivadas por 6 dias em meio livre de endotoxina sem soro, tinham reduzida a sua habilidade de liberar superóxido em resposta ao PMA, o que podia ser

revertido pela adição de LPS ao meio de cultura 20 horas antes da realização do ensaio. Pabst et al. (Pabst et al., 1982) demonstraram esse mesmo comportamento em monócitos de sangue periférico, que se mantêm ativos em cultura *in vitro* pelo tratamento com produtos bacterianos.

Outros experimentos confirmam que os macrófagos do colostro humano (0-3 dias após o parto), do leite transicional (5 a 8 dias após o parto) e do leite maduro (9 dias após o parto) podem ser primados para apresentarem uma forte atividade NADPH oxidase por meio de exposição a produtos bacterianos (Cummings et al., 1985). Os macrófagos do colostro quando estimulados com *Escherichia coli* enteropatogênica opsonizada com IgA, apresentam forte atividade NADPH oxidase e microbicida (Honorio-Franca et al., 1997).

Cummings et al. (Cummings et al., 1985) também demonstraram que os macrófagos do colostro desenvolvem uma resposta oxidativa vigorosa quando estimulados com PMA e também quando estimulados com LPS.

Em outro estudo da atividade da NADPH oxidase de macrófagos do colostro, Schroten et al (Schroten et al., 2000), mostraram que essas células são capazes de liberar ânion superóxido quando estimuladas por partículas opsonizadas e não opsonizadas de zymosan, sendo que liberam maior quantidade no segundo caso. Para Adam et al. (Adam et al., 2001), que chegaram a esses mesmos resultados, a pequena quantidade de opsoninas (como fatores do complemento e imunoglobulinas) e o trato gastrointestinal do bebê podem levar a uma melhor estimulação soro-independente dos macrófagos do colostro.

Embora os macrófagos de colostro sejam capazes de liberar ânion superóxido no trato gastrointestinal do bebê, o colostro humano também oferece proteção à mucosa no neonato por conter substâncias antioxidantes, como alfa tocoferol, cisteína, ácido ascórbico, além de catalase e glutathione peroxidase (para revisão, Goldman et al., 1986).

Desta maneira, a atividade NADPH oxidase dos macrófagos do leite humano é também considerada um importante fator imunoprotetor para os neonatos (Speer et al., 1986).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1. Justificativa

O sistema NADPH oxidase é de vital importância na defesa do hospedeiro contra infecções, sendo o responsável pela liberação de produtos microbicidas, os reativos intermediários do oxigênio. Esses produtos, também são tóxicos ao tecido circundante, o que mostra a importância do conhecimento mais aprofundado sobre a modulação do sistema NADPH oxidase.

Dispomos atualmente de amplo conhecimento sobre a linhagem mielocítica, proveniente de estudos em modelos tumorais, células sanguíneas e modelos animais. Já em macrófagos humanos, não encontramos muitos estudos, o que se deve principalmente à dificuldade em se conseguir tal tipo de células humanas (as principais fontes são o sistema broncoalveolar e gastrointestinal). Dessa forma, propusemos a realização de uma série de estudos comparativos sobre o sistema NADPH oxidase de macrófagos do colostro humano, sendo este de fácil obtenção uma fonte de macrófagos humanos “teciduais” em número satisfatório.

A comparação dos resultados obtidos entre macrófagos do colostro, monócitos de sangue periférico e células THP-1 nos permitirá um melhor entendimento sobre a regulação do sistema NADPH oxidase em diferentes fases de maturação do fagócito mononuclear humano. Além disto, a pesquisa sobre funções específicas dos macrófagos do colostro, contribuirá para o avanço do conhecimento sobre a imunobiologia do binômio mãe-filho, em particular, sobre o papel dos macrófagos do colostro na imunidade passiva conferida ao trato gastrointestinal do recém-nascido.

3.2. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi comparar aspectos específicos do sistema NADPH oxidase de macrófagos do colostro humano, com monócitos do sangue periférico e células mielomonocíticas humanas THP-1. Nosso trabalho enfocou o componente citocromo b da NADPH oxidase, em particular o gene *CYBB* que codifica a gp91-phox, glicoproteína de 91 kilodaltons, componente principal do heterodímero citocromo b. Investigaremos a regulação do sistema NADPH oxidase, analisando sua atividade e comparando a expressão dos genes que codificam componentes deste sistema, em macrófagos do colostro humano,

monócitos/macrófagos do sangue periférico e células mielomonocíticas humanas THP-1, diferenciadas com citocinas.

3.3. Objetivos Específicos

Comparar o efeito das citocinas que influenciam a atividade fagocítica, IFN- γ de maneira isolada ou associada ou associada ao TNF- α , sobre o sistema NADPH oxidase de macrófagos do colostro e monócitos do sangue periférico obtidos de puérperas saudáveis, e de células mielomonocíticas humanas da linhagem THP-1:

1. Cultivar macrófagos do colostro e monócitos sangue periférico de puérperas saudáveis com IFN- γ de maneira isolada ou associado ao TNF- α , por 48 horas.
2. Durante a cultura de macrófagos do colostro e sangue periférico de puérperas saudáveis, e células THP-1 com citocinas, examinar a atividade NADPH oxidase medindo a liberação de superóxido.
3. Examinar o padrão de expressão do gene que codifica a gp91-*phox* durante a cultura de macrófagos do colostro e monócitos do sangue periférico de puérperas saudáveis, e células mielomonocíticas humanas THP-1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção de puérperas

Foram selecionadas 77 puérperas, cuja idade variou de 18 a 40 anos, peso de 48 a 80 Kg, e altura de 1,45 a 1,80 m. Na população estudada encontramos 10% de negras, 30% de caucasóides, 5% de asiáticas e 55% de mestiças. Os critérios de seleção das possíveis doadoras foram: idade entre 18 e 40 anos, ausência de intercorrências durante o pré-natal, reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis, idade gestacional entre 38 e 41 semanas, parto normal ou cesárea de recém-nascidos saudáveis com peso adequado à idade gestacional. As puérperas receberam explicações quanto à natureza da pesquisa e assinaram um termo de consentimento esclarecido, concordando em participar da pesquisa. Os dados foram mantidos em sigilo. O protocolo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Ciências Médicas da UNICAMP, em conformidade com a resolução 96/196 do CONEP.

4.2. Coleta de Amostras de Sangue e Colostro

As amostras de colostro foram obtidas por ordenha manual das mamas. Amostras de sangue foram coletadas por punção de veia periférica. Todas as amostras foram coletadas até 72 horas após o parto.

4.3. Cultura e obtenção de monócitos / macrófagos e células THP-1

Em um primeiro momento, as amostras de colostro foram submetidas a uma centrifugação (160 x g por 15 minutos a 4°C) a fim de separarmos a fase gordurosa e a fase aquosa do botão celular, o qual em seguida foi ressuspensionado em meio RPMI. A separação das células mononucleares foi feita, tanto para as amostras de colostro quanto para as amostras de sangue, por meio de gradiente de densidade (centrifugação a 160 x g por 30 minutos) com Ficoll-Paque de densidade 1077 (Sigma) (Boyum, 1986). A coleta e o procedimento de separação de células mononucleares foram realizados em tubos de polipropileno, pois esse material não provoca a aderência dos macrófagos e monócitos.

Para os experimentos de medida da produção de ânion superóxido, os macrófagos foram deixados aderir em placas de poliestireno (placas de 12 poços contendo $1,0 \times 10^6$ células por poço), sob condições livres de endotoxina (<10 pg/ml), em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor, 2

mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C, em atmosfera úmida e saturada com 5% de CO₂ (Fischkoff, 1988, adaptado por Condino-Neto et al., 1998) por um período de 2 horas. Após o período de 2 horas de incubação, o sobrenadante rico em linfócitos foi retirado com o auxílio de uma pipeta, lavando-se o fundo do poço ou placa com o próprio sobrenadante, a fim de retirarmos a maior quantidade possível de linfócitos contaminantes.

Para os experimentos de determinação da expressão relativa do gene gp91-phox, os macrófagos foram deixados aderir em garrafas de poliestireno de 50 ml (aproximadamente 15×10^6 células / garrafa), e cultivados nas mesmas condições descritas acima.

As células THP-1 foram cultivadas em placas ou garrafas de poliestireno, com meio RPMI 1640, como descrito acima.

4.4. Tratamento Farmacológico

Células aderentes (90% de monócitos/macrófagos) foram cultivadas com interferon-gama (IFN-γ - 100 U/ml) de maneira isolada ou em associação com fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α - 1000 U/ml), por um período de 48 horas. Uma parte das amostras foi cultivada na ausência de citocinas a fim de nos fornecer o controle negativo dos experimentos.

Os experimentos utilizando células da linhagem THP-1 foram feitos de maneira diferente, visto que estas células, no cultivo na ausência de citocinas, não apresentam a característica de se aderir ao vidro e à placa de poliestireno, como acontece com os monócitos de sangue periférico e macrófagos do colostro. Dessa forma, na cultura das células THP-1, colocamos 2 ml de uma solução de concentração de 1×10^6 células / ml em cada poço de uma placa de poliestireno de 6 poços, e cultivamos com 100 U/ml de IFN-γ e 1000 U/ml de TNF-α.

4.5. Determinação da atividade NADPH oxidase

Nos monócitos / macrófagos cultivados em placas de poliestireno de 12 poços, se fez a determinação da atividade da NADPH oxidase medindo-se a liberação de superóxido por meio do ensaio da redução do citocromo c especificamente inibida pela

superóxido dismutase (SOD), de acordo com McCord & Fridovich (McCord & Fridovich, 1969, adaptada por Condino-Neto et al., 1998), sendo estudada de duas formas: espontânea (monócitos/macrófagos incubados apenas em solução de Hanks), e estimulada (monócitos/macrófagos incubados com PMA - forbol miristato acetato 30 nM). Metade dos poços continham SOD (60 U/ml) no início da reação, e foram o controle para a redução inespecífica do citocromo c, e a outra metade recebeu a mesma quantidade de SOD após 60 minutos de incubação. A absorbância da reação foi medida a 550nm ao término do tempo de incubação. O procedimento de medida da absorbância das amostras foi feito em aparelho ELISA (Labsystem Multiskan MS). A quantidade de superóxido liberada foi calculada aplicando-se o coeficiente de extinção de $21.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados (nmol de superóxido / 10^6 células / 60minutos) foram expressos pela diferença de absorbância dos tubos contendo SOD ou não.

Para os experimentos com as células THP-1, houve também uma pequena alteração no procedimento de determinação da atividade NADPH oxidase. Como realizamos a cultura das células em placas maiores (de 6 poços), o volume de solução de citocromo c empregado também foi maior (1 ml), e consequentemente a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Beckman DU 530), também em 550 nm.

O número de células após a cultura foi determinado para os experimentos de medida da liberação de ânion superóxido, pois precisávamos dessa medida a fim de fazer o cálculo relativo ao número de células. Para os experimentos de determinação da expressão relativa do gene, esse valor não se mostrou necessário, uma vez que fizemos a padronização do número inicial de células a serem colocadas em cultura para obtermos um RNA de boa qualidade e em quantidade adequada para realizarmos a sua conversão em cDNA.

4.6. Obtenção de RNA

Os monócitos/macrófagos cultivados em garrafas de poliestireno foram submetidos à extração do RNA total pelo método da guanidina-HCl (Ginsburg et al., 1985). Em seguida as amostras de RNA foram quantificadas por espectroscopia (Sambrook et al., 1989) (em 260 e 280 nm) e armazenados em -80°C até a conversão em cDNA.

Os resultados de absorbância obtidos com a espectroscopia a 260 nm foram convertidos em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ através da seguinte equação: $\text{absorbância (260 nm)} \times \text{diluição} \times 0,04 = \text{concentração de RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$.

Os resultados de absorbância a 280 nm foram utilizados para se avaliar o nível de contaminação por DNA que as amostras de RNA apresentavam. Dessa forma, uma amostra de boa qualidade (com baixa contaminação por DNA) deveria apresentar uma relação *absorbância 260 nm / absorbância 280 nm* por volta de 2.

4.7. Transcrição Reversa

As amostras de RNA foram submetidas à reação de transcrição reversa para obtermos o cDNA. Para isso utilizamos o kit SuperScript II RT (GIBCO BRL - código 18064-022), e o seguinte procedimento: utilizamos 1 μg de RNA, o qual foi adicionado aos seguintes reagentes: 2 μl de hexâmeros randômicos (50 μM), 2 μl de tampão RT (Tris-HCl 100mM, KCl 500mM e MgCl_2 10mM), 4 μl de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP e dGTP, 2,5 mM cada), 1 μl da enzima M-MuLV-RT (100 U/ μl), e 1 μl de inibidor de RNase (10 U/ μl). A solução resultante foi incubada por 60 minutos a 42°C. Após esse período de incubação, as amostras foram aquecidas por 10 minutos a 92°C para inativar a enzima transcriptase reversa. Os cDNAs resultantes foram armazenados a -20°C para posteriormente serem utilizados nas reações de PCR.

4.8. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi feita em 30 ciclos em termociclador Perkin-Elmer modelo 2400, utilizando como substrato 1 μl de cDNA numa solução final de 50 μl , contendo os seguintes reagentes nas concentrações finais: tampão PCR (Tris 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), dATP, dCTP, dTTP e dGTP (200 μM cada), MgCl_2 (1,5 mM), oligonucleotídeos iniciadores 32F-443R (400 nM cada), oligonucleotídeos iniciadores do 18S e seu competidor (na proporção de 2:8), 1 U de *Thermus aquaticus* (Taq) polimerase e água livre de nucleases. O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação de um fragmento do cDNA do gene gp91phox (32F-443R) apresentam temperatura de anelamento de 60°C e formam um produto de 411 bp. Para cada experimento utilizou-se um controle negativo, ao qual não foi adicionado

cDNA. Além desse controle negativo, também utilizamos um controle de qualidade do RNA, realizando a PCR com uma amostra de RNA, a fim de observarmos se havia contaminação por DNA.

4.9. Eletroforese

Os produtos obtidos pela PCR foram observados em gel de agarose a 3 % corado com brometo de etídeo 0,005%. Após um tempo de eletroforese de aproximadamente 30 minutos a 80 volts, quando observamos que as duas bandas (18S e gp91-phox) haviam se separado no gel, tiramos uma foto Polaroid a fim de utilizá-la para a determinação da densitometria das bandas.

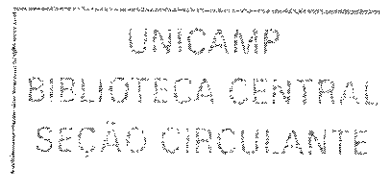
4.10. Análise da densitometria das bandas

A densitometria das bandas foi realizada por meio de análise computadorizada em equipamento ImageMaster VDS System (Pharmacia)

4.11. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise exploratória e estatística descritiva. Para descrever os grupos foram apresentadas medidas de posição e dispersão das medidas por grupo em cada experimento.

Para verificar diferença entre mais de 2 grupos foi utilizada a análise de variância simples com transformação de postos das variáveis, e o teste de comparação múltipla de Turkey. Para comparar 2 grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Milliken & Johnson, 1984; Levin, 1987; Montgomery, 1991). O nível de significância adotado foi de 5%.



5. RESULTADOS

Resultados

A seguir, são apresentados os resultados desta pesquisa. Inicialmente mostraremos a Tabela I que resume os dados referentes à atividade NADPH oxidase dos macrófagos do colostro, monócitos do sangue periférico e células THP-1, cultivados ou não com as citocinas IFN- γ e TNF- α , estimuladas ou não com PMA. As comparações foram estabelecidas entre as diversas linhagens celulares e os tratamentos farmacológicos, e foram apresentadas na forma de gráficos. O mesmo procedimento foi adotado para a apresentação dos resultados referentes aos estudos de expressão gênica.

TABELA I – Liberação espontânea e estimulada (com 30 nM de PMA) de superóxido (nmol de superóxido / 10^6 células / 60 minutos) por macrófagos do colostro, monócitos do sangue periférico e células THP-1 cultivadas por 48 horas em condições basais (controle), ou com 100 U/ml de IFN- γ isolado ou associado a 1000 U/ml de TNF- α .

Macrófagos do colostro	n	média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75
Controle espontâneo	20	4,06	2,55	3,46	0,00	8,33	2,27	6,82
Controle PMA	20	37,74	20,95	37,43	4,79	81,73	23,75	52,70
IFN- γ espontâneo	8	6,96	3,79	6,51	1,25	11,78	3,54	10,80
IFN- γ PMA	8	59,97	14,68	61,43	33,20	82,86	51,25	69,29
IFN- γ /TNF- α espontâneo	6	5,09	2,71	3,90	2,81	10,00	3,30	7,34
IFN- γ /TNF- α PMA	6	58,77	14,39	55,69	43,75	84,79	48,11	68,54

Monócitos de sangue	n	média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75
Controle espontâneo	31	2,33	2,32	1,74	0,0	8,96	0,65	3,42
Controle PMA	31	31,31	17,61	33,37	6,00	91,14	16,70	41,03
IFN- γ espontâneo	15	5,19	3,64	3,53	2,27	15,64	3,02	6,11
IFN- γ PMA	15	50,64	23,65	41,67	21,03	98,61	35,74	69,55
IFN- γ /TNF- α espontâneo	15	7,47	5,00	7,19	1,82	17,75	2,94	11,13
IFN- γ /TNF- α PMA	11	51,25	20,81	48,68	22,95	91,78	33,75	72,32

Células THP-1	n	média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75
Controle PMA	25	0,42	0,45	0,37	0,00	1,69	0,05	0,55
IFN- γ /TNF- α PMA	19	7,17	4,11	7,11	2,02	14,30	3,05	10,47

DP = desvio padrão

P25 = percentil 25

P75 = percentil 75

Colostro controle espontâneo x Sangue controle espontâneo

$p = 0,0089$ (Mann-Whitney)

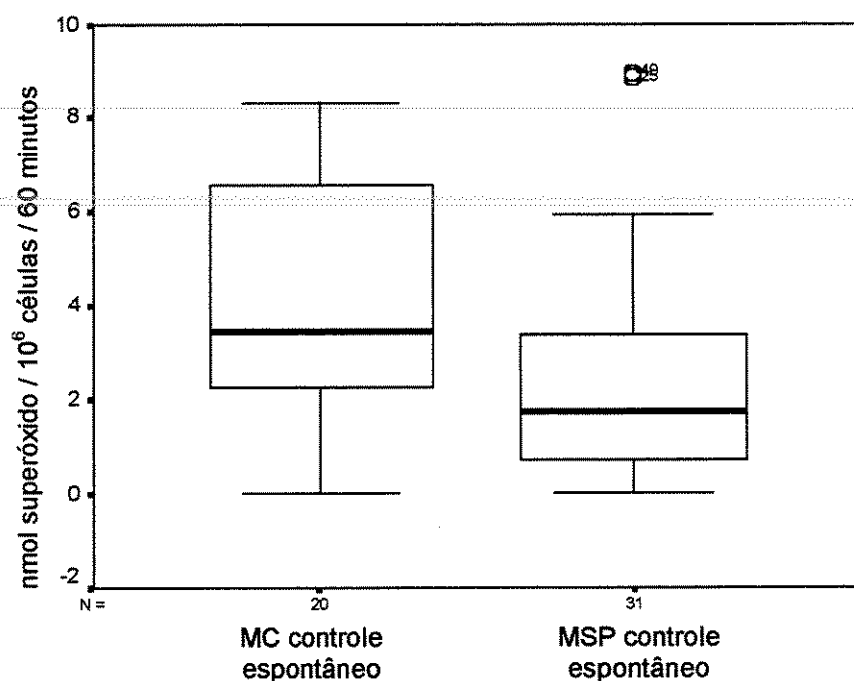


Figura 1: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção espontânea de ânion superóxido (nmol de superóxido/ 10^6 células/60 minutos) por macrófagos de colostro (MC) comparados à de monócitos de sangue periférico (MSP) cultivados em condições basais.

A produção espontânea de superóxido por macrófagos de colostro se mostrou significativamente maior que a de monócitos de sangue periférico, ambos cultivados por 48 na ausência de citocinas ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

Colostro IFN- γ espontâneo x Sangue IFN- γ espontâneo

p = 0,2081 (Mann-Whitey)

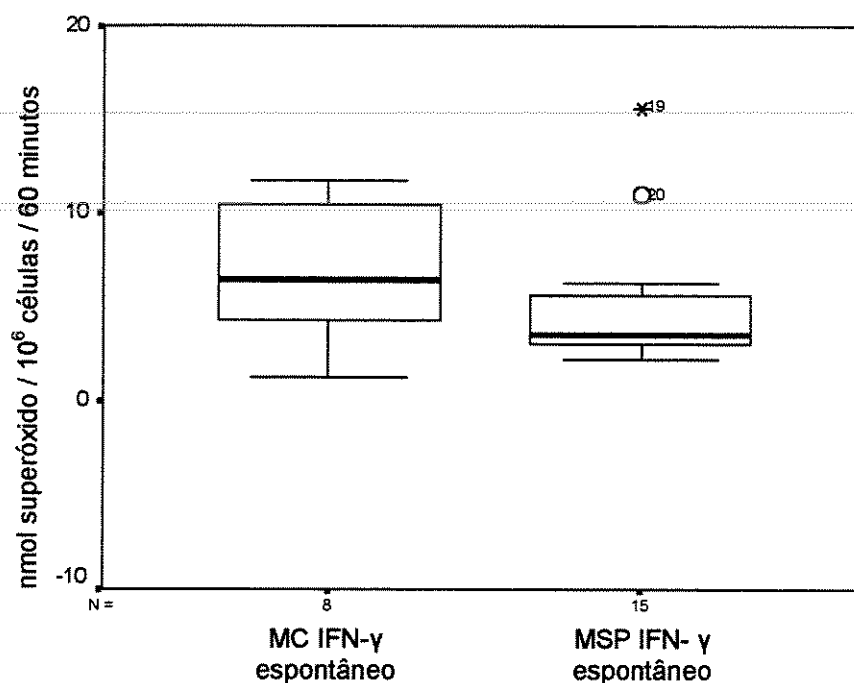


Figura 2: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção espontânea de ânion superóxido (nmol de superóxido/ 10^6 células/60 minutos) por macrófagos de colostro (MC) comparados com monócitos de sangue periférico (MSP), ambos cultivados por 48 horas com IFN- γ (100 U/ml).

A produção espontânea de superóxido por macrófagos do colostro cultivados com IFN- γ foi discretamente superior à de monócitos do sangue periférico também cultivados com IFN- γ , entretanto não se observou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney).

Colostro IFN- γ / TNF- α espontâneo x Sangue IFN- γ / TNF- α espontâneo

p = 0,4137 (Mann-Whitney)

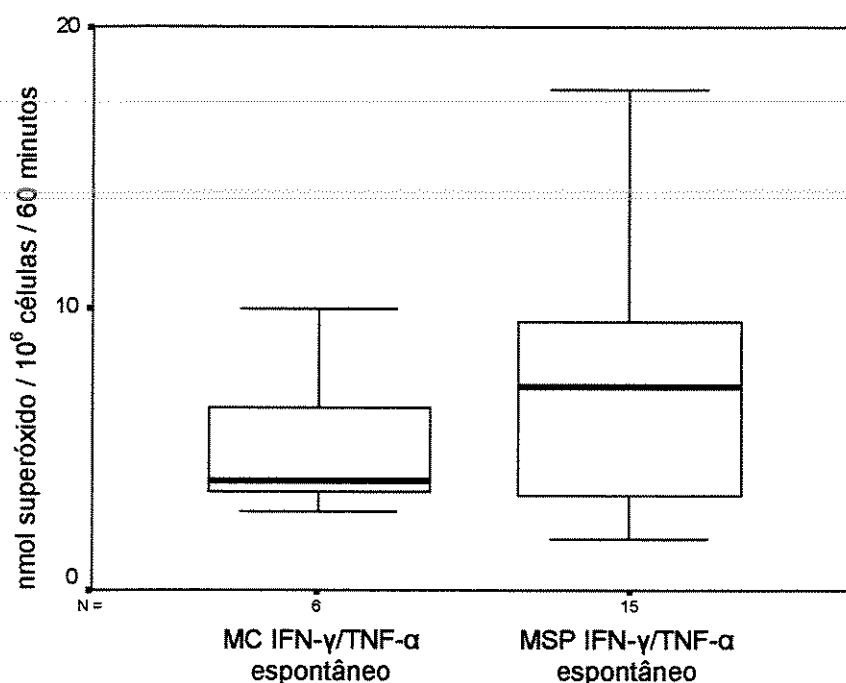


Figura 3: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção espontânea de ânion superóxido (nmol de superóxido/ 10^6 células/60 minutos) por macrófagos de colostro (MC) em comparação com monócitos de sangue periférico (MSP), ambos cultivados por 48 horas com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α .

Não houve diferença estatisticamente significativa na produção espontânea de ânion superóxido entre macrófagos de colostro e monócitos de sangue periférico incubados por 48 horas com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α , embora se observe que a liberação de superóxido por monócitos de sangue periférico se mostrou discretamente superior à de macrófagos do colostro ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney).

Colostro, Sangue, THP-1 (C, estimulado)

$p = 0,0001$ (Anova)

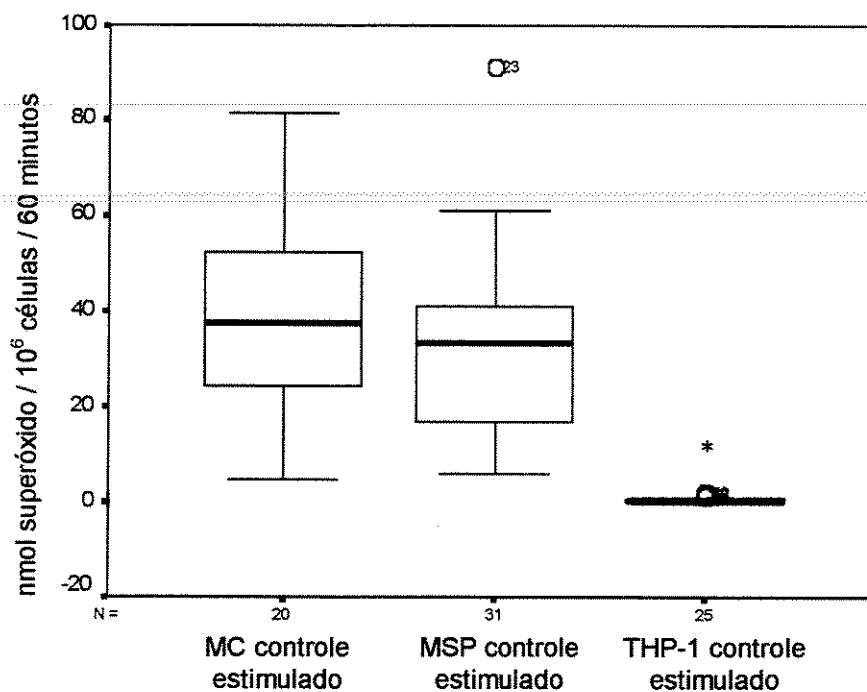


Figura 4: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção estimulada (com 30 nM de PMA) de ânion superóxido (nmol de superóxido/10⁶ células/60 minutos) por macrófagos do colostro (MC), monócitos de sangue periférico (MSP) e células THP-1, cultivados em condições basais.

A liberação estimulada de superóxido pelas células THP-1 se mostrou significativamente inferior à produção estimulada de macrófagos do colostro e de monócitos de sangue periférico, todos cultivados em condições basais ($p < 0,05$, Anova).

Colostro IFN- γ estimulado x Sangue IFN- γ estimulado

$p = 0,1857$ (Mann-Whitney)

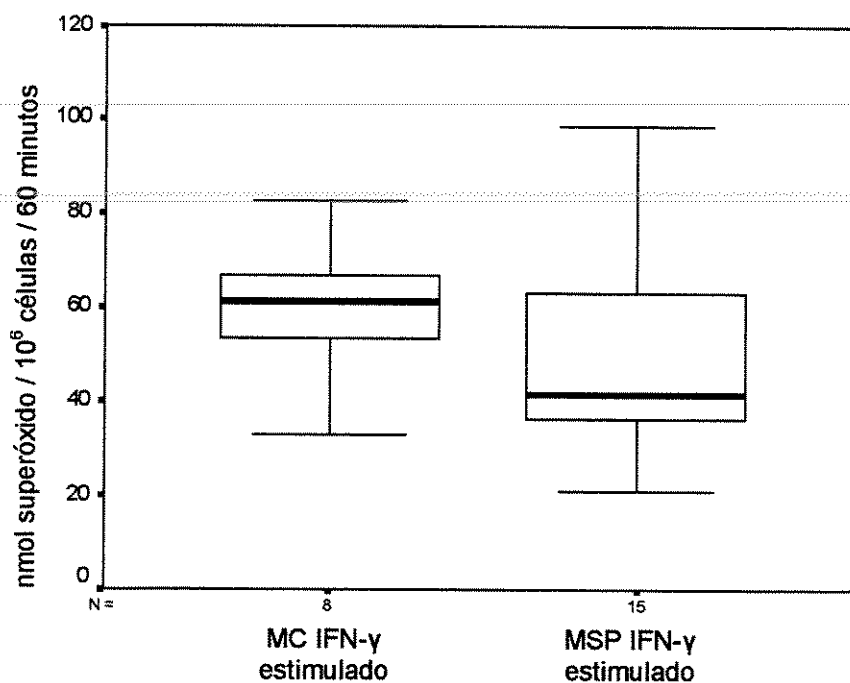


Figura 5: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção estimulada (com 30 nM de PMA) de ânion superóxido (nmol de superóxido/10⁶ células/60minutos) por macrófagos de colostro (MC) comparados a monócitos de sangue periférico (MSP), ambos incubados por 48 horas com IFN- γ (100 U/ml).

A liberação estimulada de superóxido por macrófagos do colostro cultivados com IFN- γ foi discretamente superior à de monócitos do sangue periférico cultivados com IFN- γ , embora sem haver diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney).

Colostro, Sangue, THP-1 (IFN- γ / TNF- α , estimulado)

p = 0,0001 (Anova)

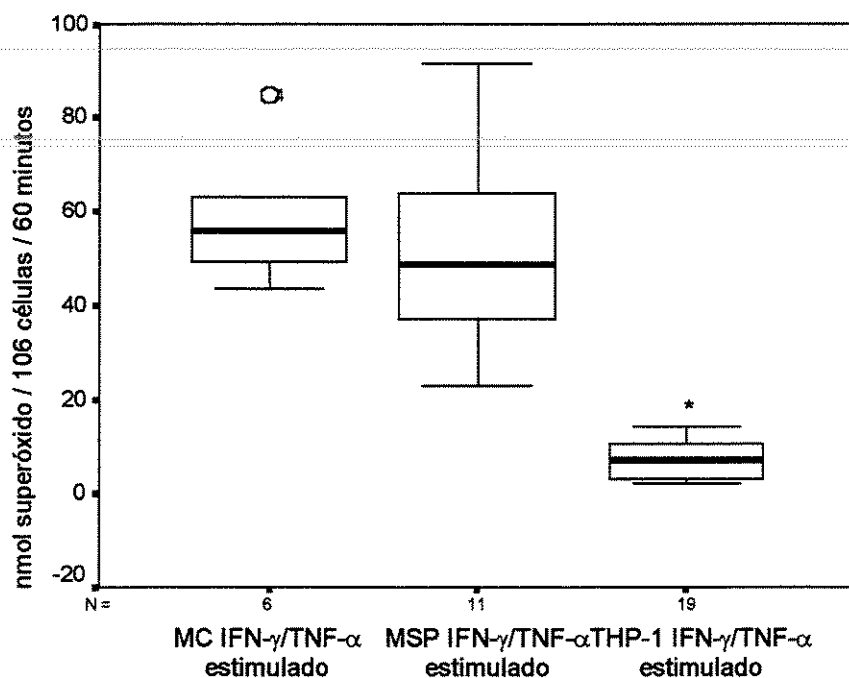


Figura 6: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção estimulada (com 30 nM de PMA) de ânion superóxido (nmol de superóxido/ 10^6 células/60 minutos) por macrófagos do colostro (MC), monócitos de sangue periférico (MSP) e células THP-1, todos cultivados com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α .

A liberação estimulada de superóxido pelas células THP-1 cultivadas com IFN- γ e TNF- α foi significativamente menor que a liberação por macrófagos do colostro e monócitos de sangue periférico, sendo que entre as duas últimas populações não encontramos diferença estatística significativa (p<0,05, Anova).

Colostro espontâneo (C, IFN- γ e IFN- γ / TNF- α)

p = 0,1967 (Anova)

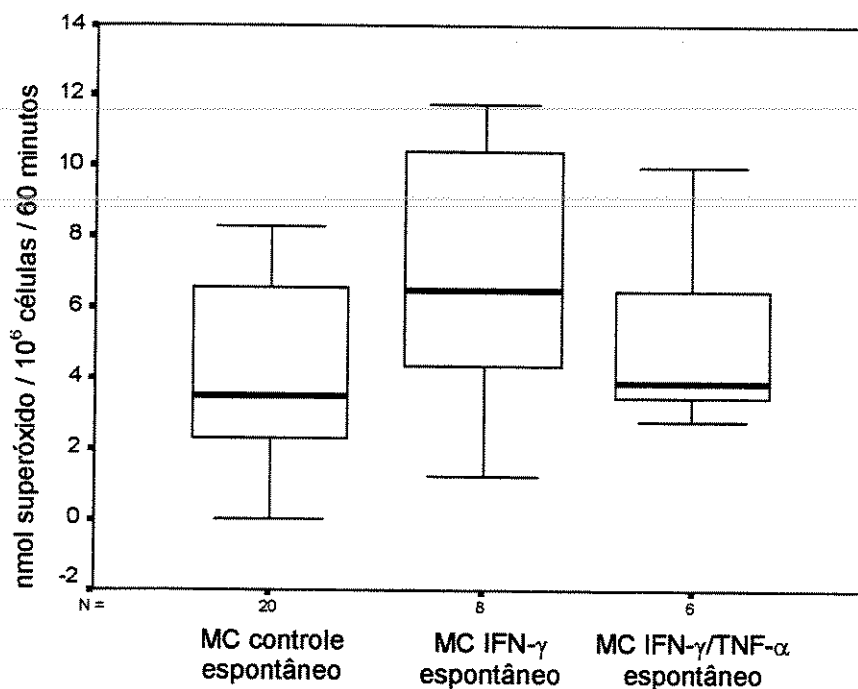


Figura 7: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção espontânea de ânion superóxido (nmol de superóxido/ 10^6 células/60 minutos) por macrófagos do colostro (MC) cultivados em condições basais, com 100 U/ml de IFN- γ ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α .

A cultura de macrófagos do colostro com IFN- γ isolado ou associado ao TNF- α não provocou um aumento estatisticamente significativo na liberação espontânea de superóxido ($p > 0,05$, Anova).

Colostro estimulado (C, IFN- γ , IFN- γ / TNF- α)

p = 0,0069 (Anova)

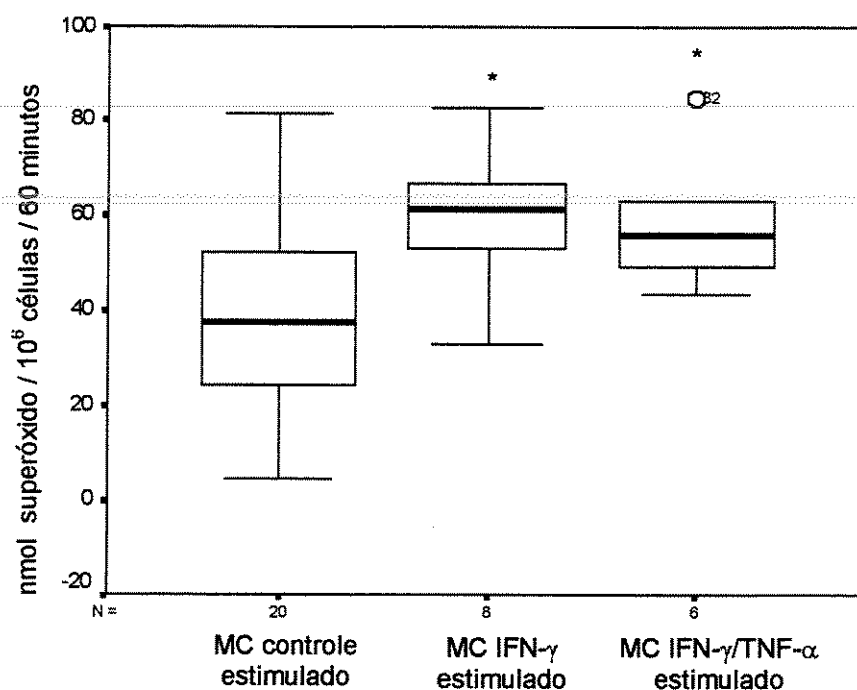


Figura 8: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção estimulada (com 30 nM de PMA) de ânion superóxido (nmol de superóxido/10⁶ células/60 minutos) por macrófagos do colostro (MC) cultivados em condições basais, com 100 U/ml de IFN- γ ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α .

A liberação estimulada de superóxido por macrófagos do colostro aumentou de forma significativa após a cultura por 48 horas com IFN- γ e também pela cultura por 48 horas com IFN- γ associado ao TNF- α (p<0,05, Anova) .

Sangue espontâneo (C, IFN, IFN- γ / TNF- α)

p = 0,0001 (Anova)

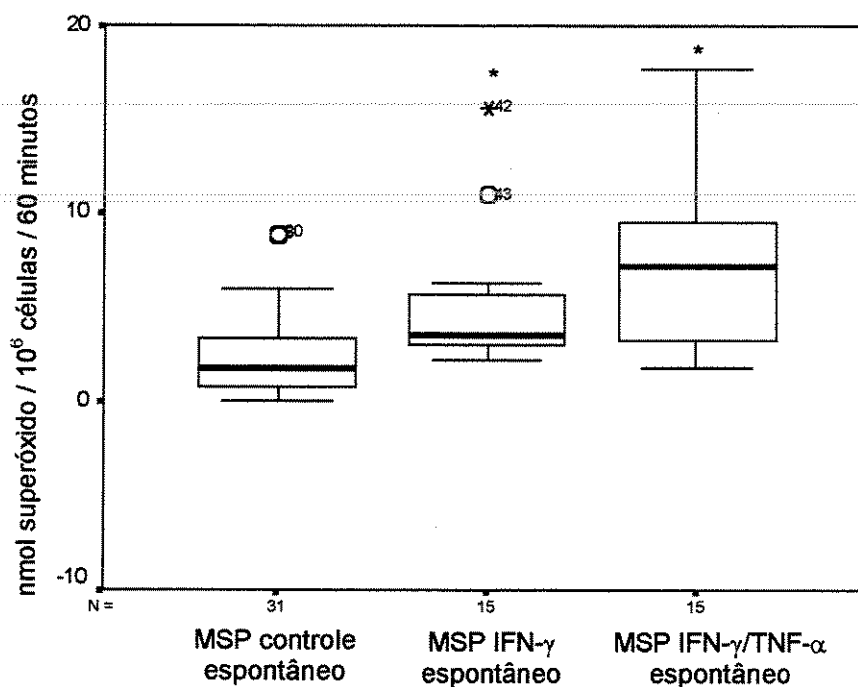


Figura 9: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção espontânea de ânion superóxido (nmol de superóxido/10⁶ células/60 minutos) por monócitos de sangue periférico (MSP) cultivados em condições basais, com 100 U/ml de IFN- γ ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α .

A cultura de monócitos de sangue periférico com IFN- γ isolado ou associado ao TNF- α aumentou de forma significativa a liberação espontânea de superóxido por essas células (p<0,05, Anova).

Sangue estimulado (C, IFN- γ , IFN- γ / TNF- α)

p = 0,0024 (Anova)

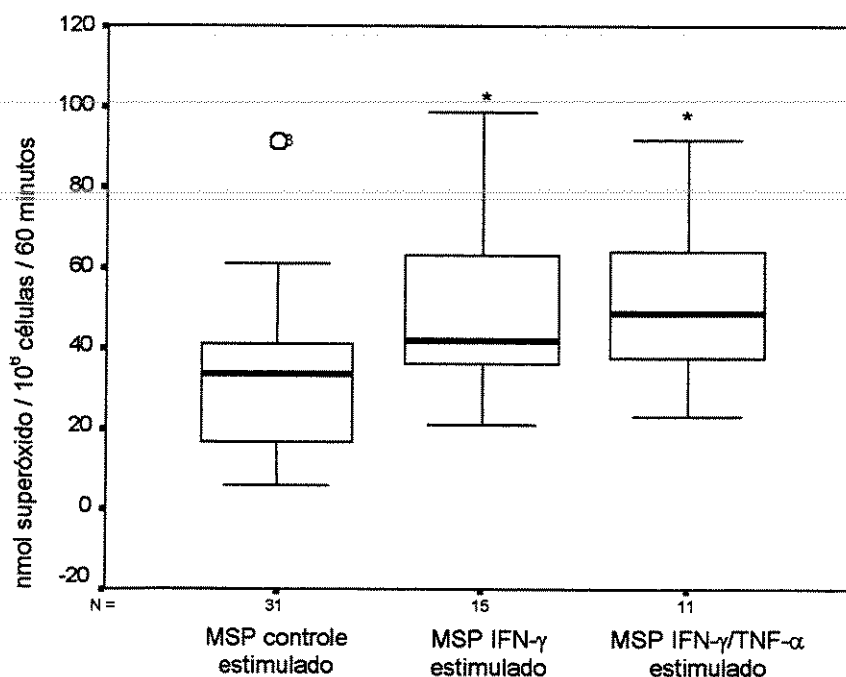


Figura 10: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção estimulada (com 30 nM de PMA) de ânion superóxido (nmol de superóxido/10⁶ células/60 minutos) por monócitos de sangue periférico (MSP) cultivados em condições basais, com 100 U/ml de IFN- γ ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α .

A liberação estimulada de superóxido por monócitos de sangue periférico sofreu um aumento significativo pela cultura com IFN- γ isolado ou associado ao TNF- α ($p < 0,05$, Anova). Não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar a liberação de superóxido por monócitos de sangue periférico cultivados com IFN- γ isolado ou associado ao TNF- α ($p > 0,05$, teste de Turkey).

THP-1 C estimulado x THP-1 IFN- γ / TNF- α estimulado

p = 0,0001 (Mann-Whitney)

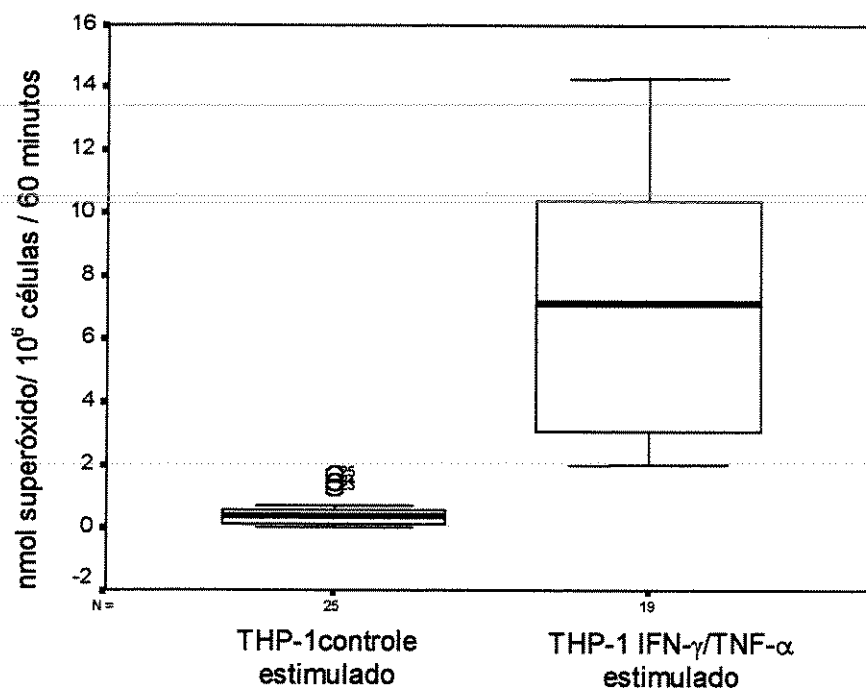


Figura 11: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da produção estimulada (com 30 nM de PMA) de ânion superóxido (nmol de superóxido/10⁶ células/60 minutos) por células THP-1 cultivadas em condições basais e células THP-1 cultivadas com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α .

A produção estimulada de ânion superóxido por células THP-1 cultivadas por 48 horas com IFN- γ e TNF- α mostrou-se significativamente maior que a de células THP-1 cultivadas por 48 horas em condições basais (controle) (p<0,05, teste de Mann-Whitney) .

TABELA II - Expressão relativa do gene gp91phox (em relação ao gene de expressão constitutiva 18S) de macrófagos do colostro, monócitos de sangue periférico e células THP-1 cultivados em condições basais (controle) ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α .

Macrófagos do colostro	n	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75
Controle	9	1,06	0,13	1,11	0,85	1,21	0,93	1,18
IFN- γ /TNF- α	11	1,02	0,05	1,01	0,96	1,12	1,00	1,06

Monócitos de sangue	n	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75
Controle	11	1,06	0,16	1,04	0,84	1,44	0,93	1,14
IFN- γ /TNF- α	11	1,10	0,13	1,07	0,99	1,45	1,01	1,16

Células THP-1	n	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75
Controle	4	0,77	0,05	0,76	0,72	0,83	0,72	0,82
IFN- γ /TNF- α	4	1,03	0,08	1,01	0,94	1,14	0,96	1,11

DP = desvio padrão

P25 = percentil 25

P75 = percentil 75

Colostro, Sangue, THP-1 (Controle)

$p = 0,0032$ (Anova)

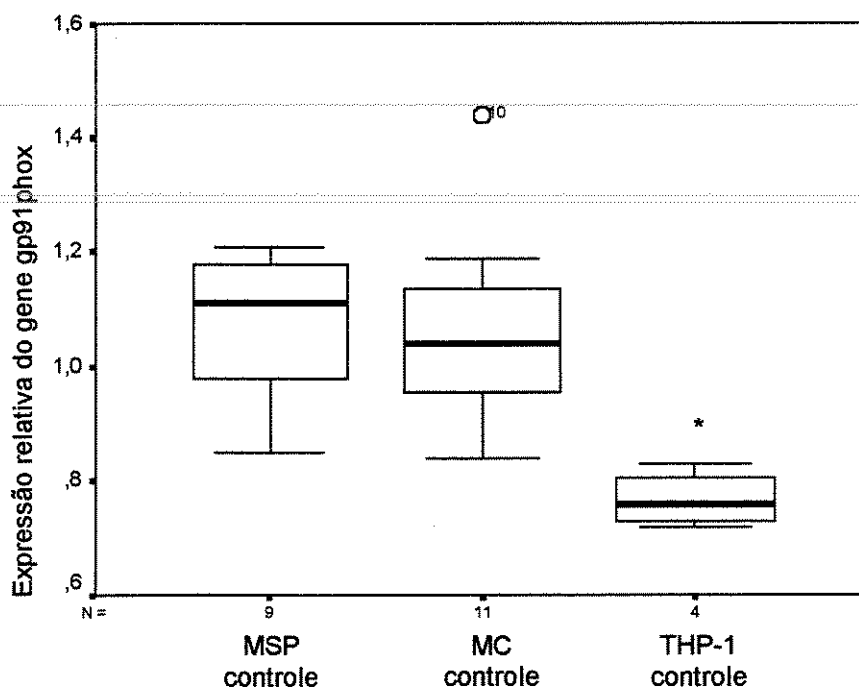


Figura 12: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da expressão relativa do gene gp91-phox (em relação ao gene de expressão constitutiva 18S) de macrófagos do colostro (MC), monócitos de sangue periférico (MSP) e células THP-1, cultivados em condições basais, durante 48 horas.

A expressão relativa do gene gp91-phox das células THP-1 cultivadas em condições basais mostrou-se significativamente inferior à expressão relativa dos macrófagos do colostro e dos monócitos de sangue periférico, cultivados nas mesmas condições. Entre os macrófagos do colostro e monócitos de sangue periférico não foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$, Anova) .

Colostro, Sangue, THP-1 (IFN- γ / TNF- α)

p = 0,2675 (Anova)

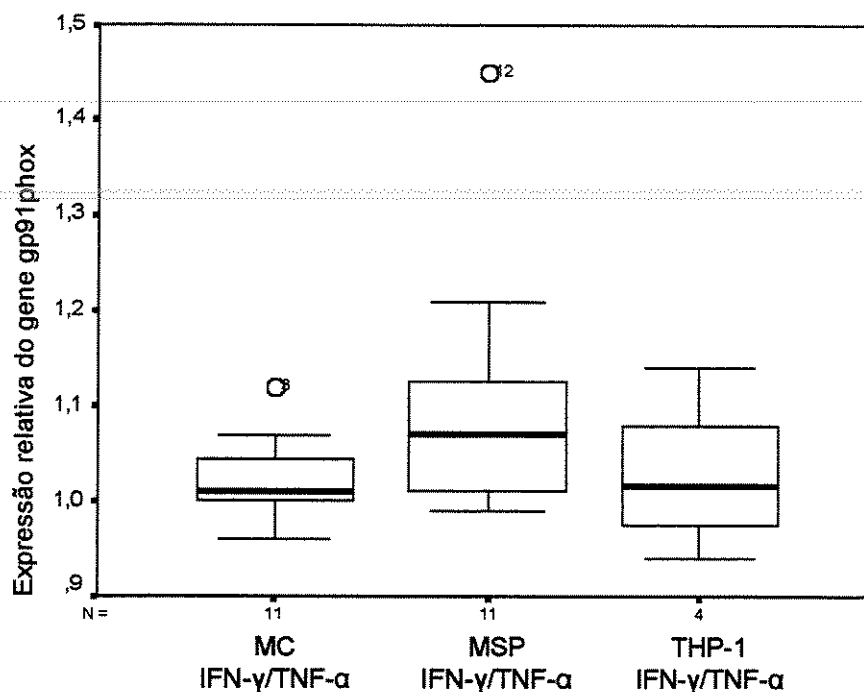


Figura 13: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da expressão relativa do gene gp91-phox (em relação ao gene de expressão constitutiva 18S) de macrófagos do colostro (MC), monócitos de sangue periférico (MSP) e células THP-1 cultivados com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α durante 48 horas.

Após a cultura por 48 horas com IFN- γ e TNF- α , observamos que a expressão relativa do gene gp91-phox das células THP-1 tornou-se equivalente aos macrófagos do colostro e monócitos de sangue periférico ($p > 0,05$, Anova).

Colostro C x Colostro IFN- γ / TNF- α

p = 0,171 (Mann-Whitney)

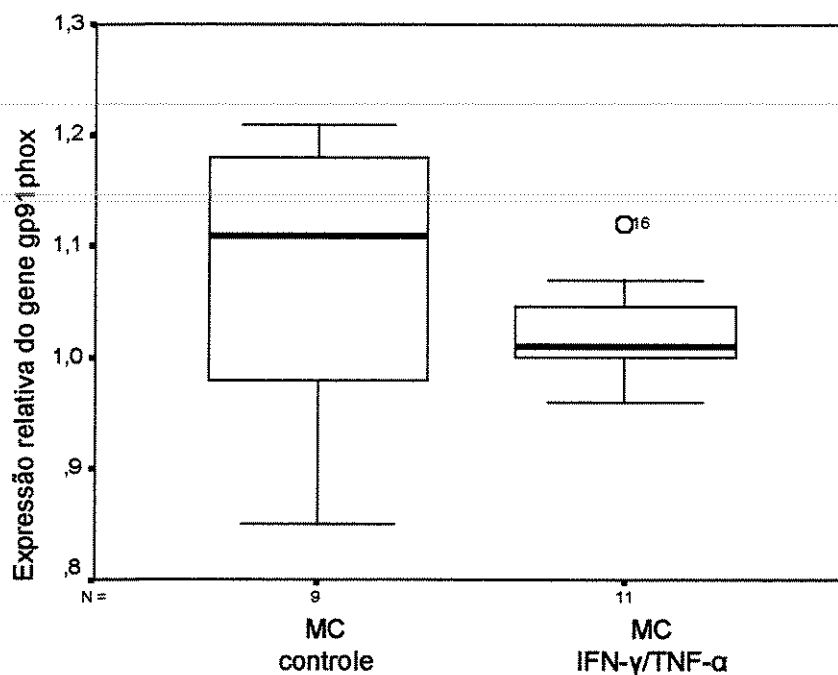


Figura 14: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da expressão relativa do gene gp91-phox (em relação ao gene de expressão constitutiva 18S) de macrófagos do colostro (MC) cultivados em condições basais ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α por 48 horas.

A cultura de macrófagos do colostro por 48 horas com IFN- γ e TNF- α , em comparação a macrófagos do colostro cultivados em condições basais, não provocou aumento estatisticamente significativo na expressão relativa do gene gp91phox (teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Sangue C x Sangue IFN- γ / TNF- α

p = 0,170 (Mann-Whitney)

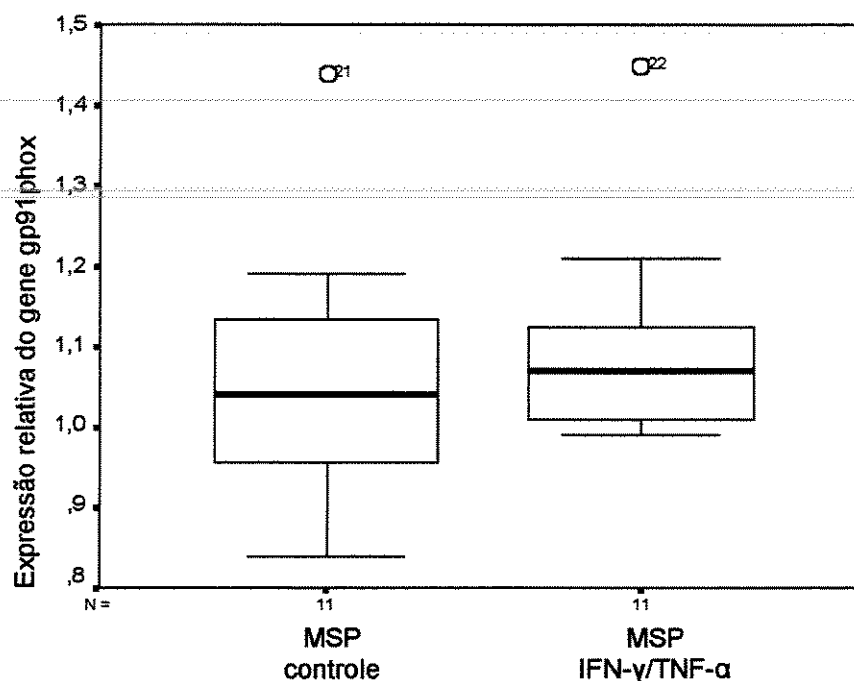


Figura 15: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da expressão relativa do gene gp91phox (em relação ao gene de expressão constitutiva 18S) de monócitos de sangue periférico (MSP) cultivados em condições basais ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α durante 48 horas.

Não encontramos diferença estatística significativa na expressão relativa do gene gp91-phox entre monócitos de sangue periférico cultivados em condições basais ou com de IFN- γ e TNF- α por 48 horas (teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

THP-1 C x THP-1 IFN- γ / TNF- α

p = 0,010 (Mann-Whitney)

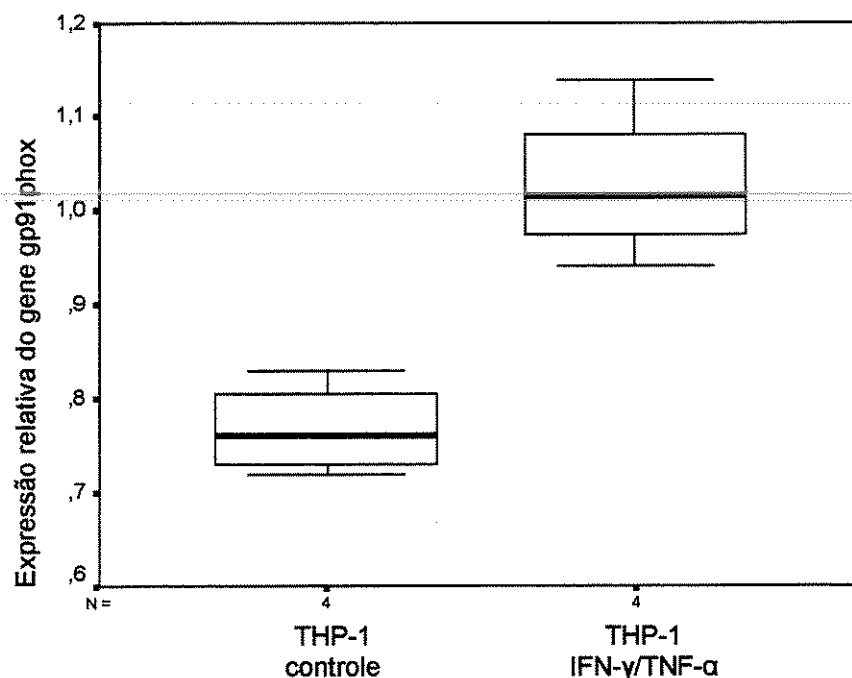


Figura 16: Boxplots construídos a partir dos dados (mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimo e máximo) da expressão relativa do gene gp91phox (em relação ao gene de expressão constitutiva 18S) de células THP-1 cultivadas em condições basais ou com 100 U/ml de IFN- γ e 1000 U/ml de TNF- α durante 48 horas.

As células THP-1 cultivadas por 48 horas com IFN- γ e TNF- α apresentaram expressão relativa do gene gp91phox significativamente maior que a de células THP-1 cultivadas em condições basais (teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1. Estudos Bioquímicos

Nossos resultados mostram que a liberação espontânea de superóxido por macrófagos do colostro foi superior à de monócitos do sangue periférico. Contudo, ao serem estimuladas com PMA e as citocinas IFN- γ e TNF- α , macrófagos de colostro e monócitos do sangue periférico apresentam atividade NADPH oxidase equivalente. A liberação de superóxido por macrófagos do colostro e monócitos do sangue periférico foi sempre superior à de células THP-1, mesmo sendo estas, estimuladas com PMA e as citocinas IFN- γ e TNF- α .

Analisando em mais detalhe o efeito das citocinas nas células mielomonocíticas humanas em nosso sistema experimental, observamos que o IFN- γ isolado ou associado ao TNF- α não influenciou significativamente a liberação espontânea de superóxido por macrófagos do colostro, quando comparados aos cultivados em condições basais. Apesar de podermos observar que em ambos os casos há uma tendência a uma maior produção de superóxido por essas células, esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa.

Ao estimular a explosão oxidativa com PMA, observamos que o IFN- γ associado ou não ao TNF- α , provocou um aumento significativo na liberação de superóxido pelos macrófagos do colostro. Isso mostra que a associação das citocinas com PMA é capaz de aumentar de forma significativa a produção de superóxido por macrófagos do colostro. Comparando-se o efeito da associação de IFN- γ e TNF- α com IFN- γ isolado em macrófagos do colostro, observamos que o TNF- α não exerceu um efeito sinérgico no estímulo da atividade NADPH oxidase espontânea ou estimulada destas células.

Analisando os mesmos parâmetros em monócitos do sangue periférico, observamos que o IFN- γ isolado ou associado ou TNF- α estimularam significativamente a liberação espontânea e estimulada de superóxido. Estes resultados obtidos com monócitos de sangue periférico confirmam o estímulo que estas citocinas exercem sobre esta população celular, como descrito na literatura. Szeffler et al. (Szeffler et al., 1989) mostraram que monócitos incubados por 48 horas com IFN- γ ou LPS se tornam primados e liberam grandes quantidades de superóxido em resposta ao estímulo de PMA ou fMLP. Dusi et al. (Dusi et al., 2001) obtiveram os mesmos resultados, mostrando que a cultura de monócitos humanos por 48 horas com IFN- γ ou TNF- α provoca um aumento significativo na produção de superóxido.

As diferenças encontradas em relação à literatura, na qual encontramos que o TNF- α exerce um efeito sinérgico quando utilizado juntamente com o IFN- γ , podem ser devidas ao fato de que as nossas amostras de sangue periférico foram coletadas de puérperas. O trauma do parto, que faz com que o sistema imunológico seja ativado a fim de se reparar as lesões, as alterações hormonais a que a mãe é submetida desde o início da gestação, além do anti-inflamatório não esteroideal que é administrado na rotina dos hospitais em que fizemos as coletas, são fatores que devem ser considerados quando comparamos aos valores encontrados na literatura, em que os estudos são feitos com monócitos de doadores adultos saudáveis.

Comparando-se a atividade NADPH oxidase entre macrófagos do colostro e monócitos de sangue periférico, encontramos que a capacidade de produção espontânea de superóxido por macrófagos de colostro cultivados em condições basais, em comparação com monócitos de sangue periférico cultivados nas mesmas condições, é significativamente maior. Esse resultado não foi observado de forma significativa quando a produção de superóxido foi estimulada com PMA, embora se possa observar que os macrófagos de colostro tenham uma tendência a produzir maior quantidade de superóxido que monócitos do sangue periférico, nessas condições. Dessa forma podemos observar que o PMA exerce um potente estímulo na ativação da NADPH oxidase, igualando a liberação de superóxido por essas duas populações celulares.

Cummings et al. (Cummings et al., 1985), medindo a liberação de superóxido por macrófagos do colostro e monócitos de sangue periférico recém-isolados e obtidos do mesmo indivíduo, encontraram resultado semelhante, mostrando que a liberação espontânea de superóxido pelos macrófagos do colostro é significativamente maior que a liberação de superóxido por monócitos de sangue periférico, enquanto a estimulação com PMA torna os valores equivalentes.

Os resultados da comparação da produção estimulada de superóxido entre macrófagos do colostro e monócitos de sangue periférico também estão de acordo com os resultados obtidos por Speer et al. (Speer et al., 1986), que mostraram que macrófagos do colostro recém isolados produzem superóxido e H₂O₂ quase nas mesmas proporções que monócitos de sangue periférico, após estímulo com PMA.

Quando comparamos macrófagos do colostro a monócitos de sangue periférico, ambos cultivados com IFN- γ isolado ou associado ao TNF- α , observamos que não há diferença estatística entre os valores encontrados. Estes resultados mostram que os macrófagos do colostro são menos sensíveis ao IFN- γ e ao TNF- α quanto à atividade NADPH oxidase, que os monócitos do sangue periférico, que têm a produção de superóxido aumentada de forma estatisticamente significativa.

Já os experimentos realizados com as células mielomonocíticas humanas THP-1 (produção de superóxido estimulada com PMA, em células controle e cultivadas com IFN- γ e TNF- α) mostram um aumento estatisticamente significativo na atividade NADPH oxidase quando se cultivou as células com a associação das duas citocinas.

Este resultado confirma o encontrado por Condino-Neto et al. (Condino-Neto et al., 1998), que em experimentos com células mielomonocíticas humanas THP-1, mostraram que essa linhagem celular se diferencia ao ser cultivada por 48 horas com IFN- γ (100 U/ml) e/ou TNF- α (1000 U/ml), sendo que a associação dessas duas citocinas apresenta forte sinergismo. O IFN- γ e o TNF- α , induzem as células mielomonocíticas THP-1 a se diferenciar e expressar atividade NADPH oxidase, citocromo b_{558} , e a transcrição dos genes que codificam os componentes gp91phox e p47phox da NADPH oxidase.

Mas, comparando-se a produção de superóxido pelas células THP-1 com monócitos de sangue periférico e macrófagos do colostro, observamos que a produção estimulada de superóxido pelas células THP-1, tanto das células controle quanto das células cultivadas com IFN- γ e TNF- α é significativamente menor que a produção das outras duas populações celulares estudadas, cultivadas nas mesmas condições.

Assim, observamos que mesmo com a grande ativação do sistema NADPH oxidase das células THP-1 provocado pela cultura com IFN- γ e TNF- α , esta não é suficiente para que a sua produção de superóxido alcance o nível dos monócitos de sangue periférico e dos macrófagos do colostro. Isso mostra que os macrófagos do colostro e os monócitos de sangue periférico sofrem a influência de outros fatores capazes de aumentar a atividade da enzima NADPH oxidase. A hipótese mais provável é que o sistema NADPH oxidase dos fagócitos mononucleares seja ativado durante a sua maturação *in vivo* por uma série de estímulos químicos com os quais as células THP-1 não entraram em contato

durante sua maturação *in vitro*. Também devemos considerar que as células THP-1 são uma linhagem leucêmica, com características genóticas distintas (Condino-Neto et al., 1998).

6.2. Expressão Gênica

A escolha do gene gp91-phox como nosso foco de estudo se deve ao fato de que esse é o principal gene da NADPH oxidase, visto que defeitos na sua expressão são responsáveis por cerca de 70% dos casos de doença granulomatosa crônica (Leusen et al., 1996).

Os resultados de nossos experimentos mostram que a cultura com IFN- γ associado ao TNF- α não influenciou o aumento da expressão do gene gp91phox em macrófagos de colostro humano, comparando-se a macrófagos de colostro cultivados na ausência de citocinas.

Em monócitos de sangue periférico, a cultura com IFN- γ e TNF- α também não provocou um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene gp91phox em comparação à cultura em condições basais.

Em contrapartida, Newburger et al. (Newburger et al., 1991) mostraram que macrófagos respondem à incubação por 24 horas com IFN- γ com o aumento da expressão da cadeia pesada do citocromo b em aproximadamente 12 vezes. Além disso, Newburger et al. (Newburger et al., 1991) também mostraram que o tratamento *in vitro* com LPS bacteriano, TNF- α , ou M- ou GM-CSF aumentam os níveis de gp91phox e, em menor extensão, dos transcritos de p22phox em macrófagos derivados de monócitos humanos cultivados. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Cassatella et al. (Cassatella et al., 1990), que mostraram que o tratamento por 24 a 48 horas com IFN- γ aumenta significativamente os níveis de gp91-phox em macrófagos derivados de monócitos.

Essa diferença observada entre os nossos resultados e os encontrados na literatura podem ser devidos a diferenças no tempo de cultura, concentração das citocinas e técnica de determinação da expressão do gene gp91-phox. Os autores acima utilizaram Northern Blot como técnica de detecção direta do nível de expressão do gene gp91-phox, enquanto nós utilizamos o RT-PCR, que é uma técnica de determinação da expressão relativa do gene, em comparação com um gene de expressão constitutiva (18S). Essa

técnica foi escolhida por nós devido à pequena quantidade de RNA disponível para realizá-la.

Já nas células da linhagem mielomonocítica THP-1, a cultura com IFN- γ e TNF- α provocou um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene gp91phox, o que está de acordo com o descrito por Condino-Neto et al. (Condino-Neto et al., 1998) para essa linhagem celular. Como já mencionamos acima, Condino-Neto et al. (Condino-Neto et al., 1998) mostraram que a cultura por 48 horas com IFN- γ e TNF- α induzem as células mielomonocíticas THP-1 a se diferenciar e expressar atividade NADPH oxidase, citocromo b₅₅₈, e a transcrição dos genes que codificam os componentes gp91-phox e p47-phox da NADPH oxidase.

Comparando-se a expressão do gene gp91-phox entre macrófagos de colostro e monócitos de sangue periférico, encontramos que tanto em condições basais, quanto na cultura na presença de IFN- γ e TNF- α , não há diferença estatisticamente significativa entre as duas populações celulares.

Comparando-se a expressão relativa do gene gp91-phox de macrófagos do colostro e de monócitos de sangue periférico com a de células THP-1, observamos que em condições basais, as células THP-1 apresentam expressão relativa do gene gp91phox significativamente menor que as outras duas populações celulares estudadas. Já a cultura com IFN- γ e TNF- α faz com que a expressão relativa do gene gp91phox das células THP-1 se torne similar à expressão relativa de monócitos de sangue periférico e macrófagos do colostro.

Assim, podemos concluir que a expressão do gene gp91-phox já se encontra modulada nos macrófagos do colostro e nos monócitos de sangue periférico, devido aos diversos estímulos que essas células sofreram durante seu processo de maturação, como IL-3, CSF-1, GM-CSF, IL-4 e IL-13 (Paul, 1999). Já as células THP-1, que são células indiferenciadas precursoras de monócitos e macrófagos e não apresentando prévia modulação, são mais susceptíveis à ação das citocinas IFN- γ e TNF- α . Além disso, o fato de as células THP-1 serem células de linhagem leucêmica (Condino-Neto et al., 1998) pode contribuir para que estas respondam de maneira diferente dos monócitos e macrófagos ao estímulo das citocinas.

Analisando os resultados dos estudos de expressão gênica, podemos observar que a expressão do gene gp91-phox aumenta de acordo com o estado de maturação do fagócito mononuclear, alcançando um estágio máximo de modulação na fase de monócito. Esses resultados estão de acordo com o descrito por Rozault et al. (Rouzaut et al., 2000), que mostraram em seus experimentos que a expressão da gp91-phox foi ativada em monócitos no final do processo de maturação induzida pelo peptídeo Pa, quando as células apresentaram marcadores associados a propriedades citotóxicas, como CD16 e CD23, o que é consistente com as propriedades imunomoduladoras já descritas para esse peptídeo, como a liberação de TNF- α e IFN- γ .

Com relação aos monócitos de sangue periférico observamos que, em comparação às células cultivadas em condições basais, a cultura com as citocinas IFN- γ e TNF- α provocou um aumento estatisticamente significativo na atividade na NADPH oxidase, mas não provocou qualquer alteração na expressão relativa do gene gp91-phox. Este resultado vai de encontro ao encontrado por Cassatella et al. (Cassatella et al., 1990) que demonstraram que o aumento da expressão de gp91phox em monócitos de sangue periférico cultivados por 24 a 48 horas na presença de rIFN- γ (100 U/ml) apresenta correlação funcional com o aumento da produção de superóxido por essas células.

Em seu trabalho, Dusi et al. (Dusi et al., 2001), também demonstraram que o aumento na produção de superóxido espontânea ou induzida por IFN- γ ou TNF- α em monócitos humanos cultivados por 48 horas, é acompanhado pelo aumento paralelo da expressão de gp91-phox, p22-phox e p47-phox, enquanto a expressão de p67-phox e p40-phox se mantém inalterada. Entretanto, os mesmos autores mostraram que o uso que oligonucleotídeos inibidores da expressão de gp91-phox e p22-phox induzida por IFN- γ ou TNF- α não afetou a modulação da atividade da NADPH oxidase por essas citocinas, o que sugere que a habilidade dos monócitos estimulados pelas citocinas IFN- γ e TNF- α de produzir superóxido independe da concentração intracelular de citocromo b₅₅₈, o que não exclui a possibilidade de que uma modulação da p47-phox possa estar envolvida na regulação da atividade NADPH oxidase.

Em macrófagos do colostro humano, a cultura por 48 horas com IFN- γ isolado ou associado ao TNF- α provocou aumento significativo apenas na atividade bioquímica

estimulada da enzima NADPH oxidase, sendo que a atividade espontânea e a expressão relativa do gene gp91-phox não sofreram aumento significativo.

Já nas células da linhagem THP-1, a cultura por 48 horas com as citocinas IFN- γ e TNF- α provocou um aumento estatisticamente significativo tanto na atividade bioquímica da NADPH oxidase quanto na expressão relativa do gene gp91-phox. Este resultado está de acordo com o encontrado por Condino-Neto et al. (Condino-Neto et al., 1998).

O fato de a expressão relativa do gene gp91-phox nas células THP-1 ter aumentado com a cultura com as citocinas a ponto de se igualar à expressão relativa deste gene em monócitos de sangue periférico e macrófagos do colostro, enquanto a atividade da enzima NADPH oxidase, mesmo com o grande aumento provocado pela cultura com as citocinas, permaneceu em um nível muito inferior com relação às outras populações celulares estudadas mostra, que outros fatores estão envolvidos na regulação da atividade NADPH oxidase, além do nível de expressão da cadeia pesada do citocromo b₅₅₈.

Durante seu processo de maturação *in vivo*, os fagócitos mononucleares podem desenvolver mecanismos pós-transcricionais que influenciam a atividade da NADPH oxidase. Esses mecanismos não estariam desenvolvidos nas células THP-1, que sofreram maturação *in vitro* apenas com o estímulo das citocinas IFN- γ e TNF- α , o que explicaria o fato de a atividade NADPH oxidase nessas células não ter aumentado na mesma proporção que a expressão do gene gp91-phox. Os mecanismos pós-transcricionais podem ter se desenvolvido pela ação dos diferentes estímulos (como IL-3, CSF-1, GM-CSF, IL-4 e IL-13) que os fagócitos mononucleares receberam durante seu processo de maturação no organismo. E, como já foi mencionado anteriormente, os monócitos de sangue periférico das puérperas podem se apresentar ainda mais ativados devido à mobilização do sistema imunológico provocado pelo trauma do parto, e pelas alterações hormonais que ocorrem durante a gestação.

Esses estímulos *in vivo* poderiam provocar a conservação do RNA produzido pelo gene *CYBB* que codifica a proteína gp91phox no citoplasma dos macrófagos do colostro e nos monócitos de sangue periférico, e não em células THP-1. Considerando essa possibilidade, o RNA sintetizado pelos macrófagos do colostro ou monócitos de sangue periférico seria responsável pela produção de uma quantidade muito maior de proteína que

em células THP-1, o que explicaria essa diferença na atividade da enzima entre as populações celulares estudadas.

Além disso devemos considerar que o isolamento de monócitos e macrófagos por aderência em plástico, que garante uma pureza de 70 a 91% (Islam & Wilkinson, 1989), altera a morfologia e a função celular. Durante a incubação, monócitos têm algumas de suas funções alteradas, passam a se espalhar na superfície do plástico, expressar proteínas de adesão e tomar uma forma semelhante a macrófagos teciduais (Bernardo et al., 1997).

Bernardo et al. (Bernardo et al., 1997) mostraram que a explosão respiratória induzida por fMLP aumenta conforme as células amadurecem nas placas de cultura por mais de 48 horas. As células aderidas ao plástico amadurecem na sua capacidade de responder a estímulos pela alteração das funções de ligação específica dos receptores da membrana, que são independentes da expressão de receptores. Assim, esse pode também ser um fator que potencialize a ativação do sistema NADPH oxidase em monócitos de sangue periférico, mesmo aqueles cultivados em condições basais, e que não ocorra com as células THP-1, visto que estas se apresentam em estado indiferenciado, sendo portanto menos sensíveis ao estímulo provocado pelo poliestireno.

Também devemos considerar como um fator que pode ter alterado os resultados, o fato de que a escala utilizada determinação da atividade NADPH oxidase nas células da linhagem THP-1 foi maior que a empregadas nos monócitos de sangue periférico e nos macrófagos do colostro. Isso ocorreu porque as células THP-1, quando indiferenciadas (controle), não apresentam as mesmas características de adesão em placas de poliestireno que monócitos de sangue periférico e macrófagos do colostro, sendo portanto eliminado esse passo do experimento.

Assim, o estudo dos macrófagos do colostro mostrou que essas células teciduais humanas em estado terminal de diferenciação e maturação permitem pouca modulação farmacológica quando comparamos a monócitos de sangue periférico e células THP-1. Ao estudarmos três populações de células mielomonocíticas em diferentes estados de diferenciação, pudemos confirmar que durante a diferenciação a resposta destas células a um estímulo externo diminui progressivamente (Paul, 1999).

O leite humano reduz a incidência e/ou a gravidade de septicemia, conjuntivite, diarreia e infecção umbilical. Bebês que não são amamentados apresentam risco seis vezes

maior de morrer de doenças infecciosas nos primeiros dois meses de vida do que aqueles que são amamentados (WHO, 2000; AAP, 1997).

Os benefícios nutricionais do leite materno, já amplamente estudados, mostram que este é o alimento ideal para os bebês (Martins-Filho, 1987), oferecendo a qualidade e quantidade ótimas de nutrientes para um bom desenvolvimento físico e intelectual. Além disso, o aleitamento materno oferece benefícios econômicos diretos para as famílias (Statement, 1997), que não precisam oferecer outro alimento para o bebê até 6 meses (WHO, 2000).

Psicologicamente, o aleitamento materno significa um forte estreitamento dos laços afetivos entre mãe e filho, o que também pode estar envolvido na modulação em longo prazo do sistema imunológico da criança, pois o conceito de psiconeuroimunologia tem demonstrado repetidamente que o estado psicológico de um indivíduo tem efeito direto na sua função imune. Dessa forma, a experiência do aleitamento por si só é um fator importante para o desenvolvimento da função imune da criança (Greene, 2001).

O efeito protetor do leite humano pela diminuição de infecções gastrointestinais e respiratórias nos primeiros meses de vida se deve em parte a suas propriedades antioxidantes, assim como a suas características microbidas (Levy, 1998). Assim, fica clara a importância do estudo dos elementos celulares do colostro e leite materno, assim como dos diversos fatores de crescimento e diferenciação, que são tão cruciais na determinação da sobrevivência pelo seu papel no desenvolvimento da competência imunológica e da tolerância, mas que ainda permanecem pouco esclarecidos (Levy, 1998).

A confirmação do caráter funcional dos macrófagos do colostro como fagócitos ativos torna ainda mais claro o papel fundamental que esse alimento exerce na proteção passiva do recém-nascido. A forte atividade NADPH oxidase desempenhada pelos macrófagos do colostro, como demonstrado por nós neste estudo, mostra que atividade fagocítica dessas células, somada às suas outras funções protetoras e aos demais fatores de proteção imunológica presentes no colostro e leite materno, são fundamentais para a manutenção da homeostase do bebê nos seus primeiros meses de vida.

7. CONCLUSÕES

Diante o exposto concluímos que:

1. Os macrófagos do colostro, considerados células mononucleares fagocitárias teciduais em etapa terminal de diferenciação celular, apresentam o sistema NADPH modulado para liberar maior quantidade de ânion superóxido, em comparação aos monócitos do sangue periférico e células THP-1.
2. As citocinas IFN- γ e TNF- α modulam o sistema NADPH oxidase de monócitos do sangue periférico, tornando a liberação de superóxido equivalente entre estes e macrófagos do colostro, o que é compatível com o avançado estado de diferenciação celular dos monócitos.
3. As citocinas IFN- γ e TNF- α modulam o sistema NADPH oxidase de células THP-1 de maneira dramática. Contudo a liberação de superóxido permanece inferior à de monócitos do sangue periférico e macrófagos do colostro, o que é compatível com a etapa inicial de diferenciação celular das células THP-1.
4. As citocinas IFN- γ e TNF- α aumentam a expressão relativa do gene gp91-phox em células THP-1, mas não em monócitos de sangue periférico e em macrófagos do colostro. Desta forma, após a cultura com as citocinas, as células THP-1 passam a apresentar expressão relativa do gene gp91-phox semelhante às outras duas populações, sem contudo apresentar atividade NADPH oxidase equivalente, demonstrando que a atividade NADPH oxidase final é o produto de diferentes eventos do metabolismo celular e está relacionada ao estado de diferenciação celular.

8. SUMMARY

Phagocytes like macrophages, granulocytes and eosinophils have a membrane-associated NADPH oxidase system, responsible for the production of superoxide and other oxygen reactive intermediates, considered critical factors for the defense against infections. The human colostrum is an important source of human macrophages. The aim of this work was to compare the NADPH oxidase activity and gp91-phox expression in 3 human myelomonocytic cell lines: colostrum macrophages, the same mother's blood monocytes, and THP-1 cells. Specifically these cells were cultured with and without IFN- γ and TNF- α during 48 hours. The assays included the spontaneous and PMA (30 nM)-induced superoxide release and the relative expression of gp91-phox by RT-PCR.

The principal results were:

1) Spontaneous superoxide release:

Colostrum macrophages cultured in basal conditions release more superoxide than blood monocytes. IFN- γ and TNF- α caused a significant increase in the superoxide release of blood monocytes. Colostrum macrophages were also stimulated by IFN- γ and TNF- α but did not reach statistical significance.

2) PMA (30 nM)-induced superoxide release:

IFN- γ and TNF- α caused a significant increase in the superoxide release by blood monocytes, colostrum macrophages and THP-1 cells. Colostrum macrophages and blood monocytes released much more superoxide than THP-1 cells in all conditions.

3) Gp91-phox expression by relative RT-PCR analysis

IFN- γ and TNF- α did not interfere in gp91-phox relative expression of colostrum macrophages. IFN- γ and TNF- α caused a discrete increase in gp91-phox expression of blood monocytes. IFN- γ and TNF- α caused a dramatic increase in gp91-phox expression of THP-1 cells. Overall, after IFN + TNF incubation, THP-1 cells, colostrum macrophages and blood monocytes presented the same relative level of gp91-phox expression.

Our conclusions were:

The basal NADPH oxidase activity is higher in colostrum macrophages compared to blood monocytes. IFN- γ and TNF- α drive blood monocytes to behave like colostrum macrophages. The NADPH oxidase activity of colostrum macrophages does not respond to IFN- γ and TNF- α . Although IFN- γ and TNF- α drive THP-1 cells, colostrum macrophages and blood monocytes to present the same relative level of gp91-phox expression, the

NADPH oxidase activity in macrophages and monocytes is much higher than in THP-1 cells. Other factors in these more mature cells up-regulate the NADPH oxidase activity, providing strong and contrasting evidence that the NADPH oxidase activity in the human myelomonocytic lineage is regulated only in part by gp91-phox gene expression.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAP American Academy of Pediatrics Work Group on Breastfeeding. *Pediatrics* **100**, 1997.

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology** (Fourth Edition), Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000.

ABDALLA, M. Y. NADPH oxidase, the macrophage killing weapon. **Free Radical and Radiation Biology Program** **1**:11, 2001.

ABO, A., WEBB, M. R., GROGAN, A. and SEGAL, A. W. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. **Biochem J** **298 Pt 3**: 585-91, 1994.

ADAM, R., KUCZERA, F., KOHLER, H. and SCHROTEN, H. Superoxide anion generation in human milk macrophages: opsonin-dependent versus opsonin-independent stimulation compared with blood monocytes. **Pediatr Res** **49**: 435-9, 2001.

AZZAWI, M. and HASLETON, P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. **Cardiovasc Res** **43**: 850-9, 1999.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest** **73**: 599-601, 1984.

BADIE, B., SCHATNER, J., VORPAHL, J. and PRESTON, K. Interferon- induces apoptosis and augments the expression of Fas and Fas ligand by microglia in vitro. **Experimental Neurology** **162**: 290-296, 2000.

BAEHNER, R. L., KUNKEL, L. M., MONACO, A. P., HAINES, J. L., CONNEALLY, P. M., PALMER, C., ET AL. DNA linkage analysis of X chromosome-linked chronic granulomatous disease. **Proc Natl Acad Sci USA** **83**: 3398-401, 1986.

BALKWILL, F. R. and HOGG, N. Characterization of human breast milk macrophages cytostatic for human cell lines. **J Immunol** **123**: 1451-6, 1979.

BAR-OR, R. Feedback mechanisms between T helper cells and macrophages in the determination of the immune response. **Mathematical Biosciences** **163**: 35-58, 2000.

BASTIAN, N. R. and HIBBS, J. B., JR. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. **Curr Opin Immunol** **6**: 131-9, 1994.

- BERNARDO, J., BILLINGSLEA, A. M., ORTIZ, M. F., SEETOO, K. F., MACAULEY, J. and SIMONS, E. R. Adherence-dependent calcium signaling in monocytes: induction of a CD14-high phenotype, stimulus-responsive subpopulation. **J Immunol Methods** **209**: 165-75, 1997.
- BEYAERT, R., FIERIS, W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. **FEBS Lett** **340**: 9-16, 1994.
- BLAU, H., PASSWELL, J. H., LEVANON, M., DAVIDSON, J., KOHEN, F. and RAMOT, B. Studies on human milk macrophages: effect of activation on phagocytosis and secretion of prostaglandin E2 and lysozyme. **Pediatr Res** **17**: 241-5, 1983.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** **21**: 1-77, 1986.
- CASSATELLA, M. A., BAZONNI, F., FLYNN, R. M., DUSI, S., TRINCHIERI, G. and ROSSI, F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. **J Biol Chem** **265**: 20241-6, 1990.
- CASSATELLA, M. A., DELLA BIANCA, V., BERTON, G. and ROSSI, F. Activation by gamma interferon of human macrophage capability to produce toxic oxygen molecules is accompanied by decreased Km of the superoxide-generating NADPH oxidase. **Biochem Biophys Res Commun** **132**: 908-14, 1985.
- CHENSUE, S. W., REMICK, D. G., SHMYR-FORSCH, C., BEALS, T. F. and KUNKEL, S. L. Immunohistochemical demonstration of cytoplasmic and membrane-associated tumor necrosis factor in murine macrophages. **Am J Pathol** **133**: 564-72, 1988.
- CLEMENTE, J., CLERICI, N., ESPINOSA, M. A. and LEYVA-COBIAN, F. Defective chemotactic response of human alveolar and colostral macrophages. **Immunol Lett** **12**: 271-6, 1986a.
- CLEMENTE, J., LEYVA-COBIAN, F., HERNANDEZ, M. and GARCIA-ALONSO, A. Intracellular immunoglobulins in human milk macrophages. Ultrastructural localization and factors affecting the kinetics of immunoglobulin release. **Int Arch Allergy Appl Immunol** **80**: 291-9, 1986b.

- COLE, F. S., SCHNEEBERGER, E. E., LICHTENBERG, N. A. and COLTEN, H. R. Complement biosynthesis in human breast-milk macrophages and blood monocytes. **Immunology** **46**: 429-41, 1982.
- CONDINO-NETO, A., WHITNEY, C. and NEWBURGER, P. E. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. **J Immunol** **161**: 4960-7, 1998.
- CRAGO, S. S., PRINCE, S. J., PRETLOW, T. G., MCGHEE, J. R. and MESTECKY, J. Human colostral cells. I. Separation and characterization. **Clin Exp Immunol** **38**: 585-97, 1979.
- CROSS, A. R., CURNUTTE, J. T., RAE, J., HEYWORTH, P. G. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease. **Blood Cells Mol Dis** **22**: 90-5, 1996.
- CUMMINGS, N. P., NEIFERT, M. R., PABST, M. J. and JOHNSTON, R. B., JR. Oxidative metabolic response and microbicidal activity of human milk macrophages: effect of lipopolysaccharide and muramyl dipeptide. **Infect Immun** **49**: 435-9, 1985.
- DINAUER, M. C., PIERCE, E. A., BRUMS, G. A., CURNUTTE, J. T., ORKIN, S. H. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. **J Clin Invest** **86**: 1729-37, 1990.
- DUSI, S., DONINI, M., LISSANDRINI, D., MAZZI, P., BIANCA, V. D. and ROSSI, F. Mechanisms of expression of NADPH oxidase components in human cultured monocytes: role of cytokines and transcriptional regulators involved. **Eur J Immunol** **31**: 929-38, 2001.
- EKLUND, E. A., LUO, W., SKALNIK, D. G. Characterization of three promoter elements and cognate DNA binding protein(s) necessary for IFN-gamma induction of gp91-phox transcription. **J Immunol** **157**: 2418-29, 1996.
- EKLUND, E. A., SKALNIK, D. G. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. **J Biol Chem** **270**: 8267-73, 1995.
- EL BENNA, J., FAUST, L. P., BABIOR, B. M. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47-phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites

recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. **J Biol Chem** **269**: 23431-6, 1994.

FISCHKOFF, S. A. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. **Leukemia Research** **12**: 679-686, 1988.

FORMAN, H. J., TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling. Respiratory burst in macrophage signaling. **Am J Respir Crit Care Med** **166**: 54-58, 2002.

GABIG, T. G., CREAM, C. D., MANTEL, P. L., ROSLI, R. Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. **Blood** **85**: 804-11, 1995.

GESSANI, S., BELARDELLI, F. IFN-g expression in macrophages and its possible biological significance. **Cytokine & Growth Factor Reviews** **9**: 117-123, 1998.

GINSBURG, D., HANDIN, R. I., BONTHRON, D. T., ET AL. Human von Willebrand factor: isolation of complementary DNA clones and chromosomal location. **Science** **228**: 1401-1406, 1985.

GOLDMAN, A. S. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. **Pediatr Infect Dis J** **12**: 664-71, 1993.

GOLDMAN, A. S. and GOLDBLUM, R. M. Transfer of maternal leukocytes to the infant by human milk. **Curr Top Microbiol Immunol** **222**: 205-13, 1997.

GOLDMAN, A. S., THORPE, L. W., GOLDBLUM, R. M. and HANSON, L. A. Anti-inflammatory properties of human milk. **Acta Paediatr Scand** **75**: 689-95, 1986.

GREENE, A. Benefits To Breastfeeding, Vol. 2002, 2001.

GRUMACH, A. S. **Alergia e Imunologia na Infância e na Adolescência**. Capítulo "Desenvolvimento do Sistema Imune na Criança", São Paulo, Brasil: Atheneu, 2001.

HALLIWELL, B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. **Ann Rheum Dis** **54**: 505-10, 1995.

HEEREBEEK, L. V., MEISCHL, C., STOOKER, W., MEIJER, C. J. L., NILSSEN, H. W. M., ROOS, D. NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? **J Clin Pathol** **55**: 561-568, 2002.

HELLER, R. A. and KRONKE, M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. **J Cell Biol** **126**: 5-9, 1994.

- HEUSEL, J. W., HANSON, R. D., SILVERMAN, G. A., LEY, T. J. Structure and expression of a cluster of human hematopoietic serine protease genes found on chromosome 14q11.2. **J Biol Chem** **266**: 6152-8, 1991.
- HONORIO-FRANCA, A. C., CARVALHO, M. P., ISAAC, L., TRABULSI, L. R., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. **Scand J Immunol** **46**: 59-66, 1997.
- ISLAM, L. N. and WILKINSON, P. C. Evaluation of methods for isolating human peripheral blood monocytes. Studies on chemotactic locomotion and other functional characteristics. **J Immunol Methods** **121**: 75-84, 1989.
- JESAITIS, A. J., BUESCHER, E. S., HARRISON, D., QUINN, M. T., PARKOS, C. A., LIVESEY, S. ET AL. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. **J Clin Invest** **85**: 821-35, 1990.
- JOHNSON, D. F., FRANCE, G. L., MARMER, D. J. and STEELE, R. W. Bactericidal mechanisms of human breast milk leukocytes. **Infect Immun** **28**: 314-8, 1980.
- KELLY, D. and COUTTS, A. G. P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science** **66**: 161-167, 2000.
- KIM, C., DINAUER, M. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. **The Journal of immunology** **166**: 1223-1232, 2001.
- KJELDSSEN, L., BAINTON, D. F., SENGELOV, H., BORREGAARD, N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fraction. **Blood** **82**: 3183-91, 1993.
- KNAUSS, U. G., MORRIS, S., DONG, H. J., CHERNOFF, J., BOKOCH, G. M. Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. **Science** **269**: 221-3, 1995.
- KOHL, S., PICKERING, L. K., CLEARY, T. G., STEINMETZ, K. D., LOO, L. S. Human colostral cytotoxicity. II. Relative defects in colostral leukocyte cytotoxicity and inhibition of peripheral blood leukocyte cytotoxicity by colostrum. **J Infect Dis** **142**: 884-91, 1980.

- LACY, P., MAHMUDI-AZER, S., BABLITZ, B., GILCHRIST, M., FITZHARRIS, P., CHENG, D., MAN, S. F., BOKOCH, G. M. and MOQBEL, R. Expression and translocation of Rac2 in eosinophils during superoxide generation. **Immunology** **98**: 244-52, 1999.
- LEE, J. H., LEE, K. S., CHUNG, T. and PARK, J. C-terminal region of the cytosolic subunit p47(phox) is a primary target of conformational change during the activation of leukocyte NADPH oxidase. **Biochimie** **82**: 727-32, 2000.
- LETO, T. L., LOMAX, K. J., VOLPP, B. D., NUNOL, H., SECHLER, J. M., NAUSEEF, W. M., ET AL. Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. **Science** **248**: 727-30, 1990.
- LEUSEN, J. H. W., VERHOEVEN, A. J. and ROOS, D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: A review about the intrigues in the phox family. **Front Biosci** **1**: d72-90, 1996.
- LEVIN, J. **Estatística Aplicada a Ciências Humanas**: Ed. Harbra, 1987.
- LEVY, J. Immunonutrition: the pediatric experience. **Nutrition** **14**: 641-647, 1998.
- LEYVA-COBIAN, F. and CLEMENTE, J. Phenotypic characterization and functional activity of human milk macrophages. **Immunol Lett** **8**: 249-56, 1984.
- LIU, R., BUETTNER, G. R. and OBERLEY, L. W. Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF-alpha. **Free Radic Biol Med** **28**: 1197-205, 2000.
- LUO, W., SKALNIK, D. G. CCAAT displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91-phox promoter. **J Biol Chem** **271**: 18203-10, 1996.
- MANDYLA, H., XANTHOU, M., MARAVELIAS, C., BAUM, D., MATSANIOTIS, N. Antibody dependent cytotoxicity of human colostrum phagocytes. **Pediatr Res** **16**: 995-9, 1982.
- MARTINS-FILHO, J. Composição e características do leite humano e do colostro. Comparação com outros leites: vaca, cabra e soja. In: **Como e Porque Amamentar**, São Paulo: Savier, 1987.
- MCCORD, J., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** **224**, 1969.

- MEIER, B., RADEKE, H. H., SELLE, S., YOUNES, M., SIES, H., RESCH, K. and HABERMEHL, G. G. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. **Biochem J** **263**: 539-45, 1989.
- MILLIKEN, G. A., JOHNSON, D. E. **Analysis of Messy Data**, New York: Van Nostrand Renhold Company, 1984.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments** (Third Edition), New York: John Wiley & Sons, 1991.
- MOUTHYS-MICKALAD, A., DEBY-DUPONT, G., NYS, M., LAMY, M. and DEBY, C. Oxidative processes in human promonocytic cells (THP-1) after differentiation into macrophages by incubation with Chlamydia pneumoniae extracts. **Biochem Biophys Res Commun** **287**: 781-8, 2001.
- NAKAJIMA, S., BABA, A. S. and TAMURA, N. Complement system in human colostrum: presence of nine complement components and factors of alternative pathway in human colostrum. **Int Arch Allergy Appl Immunol** **54**: 428-33, 1977.
- NEWBURGER, P. E., DAL, Q. and WHITNEY, C. In vitro regulation of human phagocyte cytochrome b heavy and light chain gene expression by bacterial lipopolysaccharide and recombinant human cytokines. **J Biol Chem** **266**: 16171-7, 1991.
- NEWBURGER, P. E., SKALNIK, D. G., HOPKINS, P. J., EKLUND, E. A., CURNUTTE, J. T. Mutations in the promoter region of the gene for gp91-phox in X-linked chronic granulomatous disease with decreased expression of cytochrome b558. **J Clin Invest** **94**: 1205-11, 1994.
- NEWMAN, J. How breast milk protects newborns. **Sci Am** **273**: 76-9, 1995.
- NUNOI, H., ROTROSEN, D., GALLIN, J. I., MALECH, H. L. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. **Science** **242**: 1298-301, 1988.
- OGRA, P. L. and GREENE, H. L. Human milk and breast feeding: an update on the state of the art. **Pediatr Res** **16**: 266-71, 1982.
- OSSINA, N. K., CANNAS, A., POWERS, V. C., FITZPATRICK, P. A., KNIGHT, J. D., GILBERT, J. R., SHEKHTMAN, E. M., TOMEI, L. D., UMANSKY, S. R. and KIEFER, M. C. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. **J Biol Chem** **272**: 16351-7, 1997.

- OUTTERIDGE, P. M. and LEE, C. S. Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages. **Adv Exp Med Biol** **137**: 513-34, 1981.
- PABST, H. F. Immunomodulation by breast-feeding. **Pediatr Infect Dis J** **16**: 991-5, 1997.
- PABST, M. J., HEDEGAARD, H. B. and JOHNSTON, R. B., JR. Cultured human monocytes require exposure to bacterial products to maintain an optimal oxygen radical response. **J Immunol** **128**: 123-8, 1982.
- PARKOS, C. A., DINAUER, M. C., WALKER, L. E., ALLEN, R. A., JESAITIS, A. J., ORKIN, S. H. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. **Proc Natl Acad Sci USA** **85**: 3319-23, 1988.
- PAUL, W. E. **Fundamental Immunology** (Fourth Edition): L W & W Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- PITT, J., BARLOW, B. and HEIRD, W. C. Protection against experimental necrotizing enterocolitis by maternal milk. I. Role of milk leukocytes. **Pediatr Res** **11**: 906-9, 1977.
- PITTARD, W. B., 3RD, POLMAR, S. H. and FANAROFF, A. A. The breastmilk macrophage: a potential vehicle for immunoglobulin transport. **J Reticuloendothel Soc** **22**: 597-603, 1977.
- QUINN, M. T., PARKOS, C. A., WALKER, L., ORKIN, S. H., DINAUER, M. C., JESAITIS, A. J. Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. **Nature** **342**: 198-200, 1989.
- ROOS, D., DE BOER, M., KURIBAYASHI, F., MEISCHL, C., WEENINGS, R. S., SEGAL, A. W., ET AL. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Blood** **87**: 1663-81, 1996.
- ROSSI, F., ZATTI, M., Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leukocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. **Experientia** **20**: 21-3, 1964.
- ROUZAUT, A., LOPEZ-MORATALLA, N. and DE MIGUEL, C. Differential gene expression in the activation and maturation of human monocytes. **Arch Biochem Biophys** **374**: 153-60, 2000.
- ROYER-POKORA, B., KUNKEL, L. M., MONACO, A. P., GOFF, S. C., NEWBURGER, P. E., BAEHNER, R. L., ET AL. Cloning the gene for the inherited disorder chronic

- granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. **Cold Spring Harb Quant Biol** **51**: 177-83, 1986.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning** (Second Edition): Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- SAUER, H., WARTENBERG, M. and HESCHELER, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. **Cell Physiol Biochem** **11**: 173-86, 2001.
- SCHROTEN, H., KUCZERA, F., KOHLER, H. and ADAM, R. Opsonophagocytosis versus lectinophagocytosis in human milk macrophages. **Adv Exp Med Biol** **478**: 95-107, 2000.
- SCHULZE-OSTHOFF, K., BAKKER, A. C., VANHAESEBROECK, B., BEYAERT, R., JACOB, W. A. and FIERIS, W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. **J Biol Chem** **267**: 5317-23, 1992.
- SCOTT, E. W., SIMON, M. C., ANASTASI, J., SINGH, H. Requirements of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. **Science** **265**: 1573-7, 1994.
- SEGAL, A. W. and SHATWELL, K. P. The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. **Ann N Y Acad Sci** **832**: 215-22, 1997.
- SENO, T., INOUE, N., GAO, D., OKUDA, M., SUMI, Y., MATSUI, K., ET AL. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. **Thromb Res** **103**: 399-409, 2001.
- SHIMIZU, T., NIKLASSON, A. and STRANDVIK, B. Leukotriene B₄ and C₄ generation by human colostral macrophages in vitro. **Biol Neonate** **63**: 65-9, 1993.
- SKALNIK, D. G., STRAUSS, E. C., ORKIN, S. H. CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. **J Biol Chem** **266**: 16736-44, 1991.
- SMITH, L. T., HOHAUS, S., GONZALEZ, D. A., DZIENNIS, S. E., TENEN, D. G. PU-1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. **Blood** **88**: 1234-47, 1996.

- SPEER, C. P., GAHR, M. and PABST, M. J. Phagocytosis-associated oxidative metabolism in human milk macrophages. **Acta Paediatr Scand** **75**: 444-51, 1986.
- SRIKANTH, S., RADO, T. A. A 30-base pair element is responsible for the myeloid-specific activity of the human neutrophil elastase promoter. **J Biol Chem** **269**, 1994.
- SRIVASTAVA, M. D., SRIVASTAVA, A., BROUHARD, B., SANETO, R., GROH-WARGO, S. and KUBIT, J. Cytokines in human milk. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol** **93**: 263-87, 1996.
- STATEMENT, P. Breastfeeding and the Use of Human Milk. **Pediatrics** **100**: 1035-1039, 1997.
- SUPERTI-FUGA, G., BARBERIS, A., SCHREIBER, E., BUSSLINGER, M. The protein CDP, but not CP1, footprints on the CCAAT region of the gamma-globin gene in unfractionated B-cell extracts. **Biochim Biophys Acta** **1007**: 237-42, 1989.
- SZEFLER, S. J., NORTON, C. E., BALL, B., GROSS, J. M., AIDA, Y., PABST, M. J. IFN-gamma and LPS overcome glucocorticoid inhibition of priming for superoxide release in human monocytes. Evidence that secretion of IL-1 and tumor necrosis factor-alpha is not essential for monocyte priming. **J. Immunol.** **142**: 3985-92, 1989.
- VASSAO, R. C. and CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Phagocytic activity of human colostrum macrophages. **Braz J Med Biol Res** **22**: 457-64, 1989.
- VOLPP, B. D., NAUSEEF, W. M., CLARK, R. A. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. **Science** **242**: 1295-7, 1988.
- WAGNER, C. L., FORSYTHE, D. W. and PITTARD, W. B. Variation in the biochemical forms of transforming growth factor-alpha present in human milk and secreted by human milk macrophages. **Biol Neonate** **68**: 325-33, 1995.
- WANG, J. P., RAUNG, S. L., TSAO, L. T. and LIN, C. N. Evidence for the involvement of protein kinase C inhibition by norathyriol in the reduction of phorbol ester-induced neutrophil superoxide anion generation and aggregation. **Eur J Pharmacol** **336**: 81-8, 1997.
- WEAVER, E. A., TSUDA, H., GOLDBLUM, R. M., GOLDMAN, A. S. and DAVIS, C. P. Relationship between phagocytosis and immunoglobulin A release from human colostrum macrophages. **Infect Immun** **38**: 1073-7, 1982.

WHO Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. **Lancet** **355**: 451-55, 2000.

WIENTJES, F. B., HSUAN, J. J., TOTTY, N. F., SEGAL, A. W. p40-phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain ser homology 3 domains. **Biochem J** **296**: 557-61, 1993.

WOODMAN, R. C., NEWBURGER, P. E., ANKLESARIA, P., ERICKSON, R. W., RAE, J., COHEN, M. S. ET AL. A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells. **Blood** **85**: 231-41, 1995.

YAGISAWA, M., YUO, A., YONEMARU, M., IMAJOH-OHMI, S., KANEGASAKI, S., YAZAKI, Y. and TAKAKU, F. Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes: correlation between functional capacity and amount of functional proteins. **Biochem Biophys Res Commun** **228**: 510-6, 1996.

YANG, S., HARDAWAY, M., SUN, G., RIES, W. L. and KEY, L. L., JR. Superoxide generation and tyrosine kinase. **Biochem Cell Biol** **78**: 11-7, 2000.

ZHAN, S., VAZQUEZ, N., WIENTJES, F. B., BUDARF, M. L., RIED, T., ET AL. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. **Blood** **88**: 2714-21, 1996.

10. ANEXO

Figura I: Montagem e ativação do Sistema NADPH oxidase.

