

JUAN ÁLVARO LÓPEZ QUINTERO

***DESENVOLVIMENTO E REGULAÇÃO DO SISTEMA
NADPH OXIDASE NA LINHAGEM EOSINOFÍLICA
HUMANA***

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de
Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

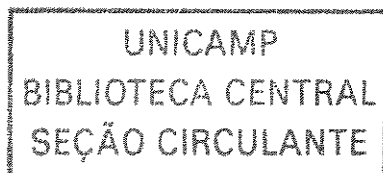
Campinas, 20 de agosto de 2004.



Prof. Dr. Antonio Condino Neto
Orientador

CAMPINAS

2004



JUAN ALVARO LÓPEZ QUINTERO

**DESENVOLVIMENTO E REGULAÇÃO DO SISTEMA
NADPH OXIDASE NA LINHAGEM EOSINOFÍLICA
HUMANA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Farmacologia*

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Antonio Condino-Neto*

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T UNICAMP
	L881d
V	EX
TOMBO BC/	61686
PROC.	10-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	03-1-05
Nº CPD	

BIBID 338978

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

L881d López Quintero, Juan Alvaro
Desenvolvimento e regulação do sistema NADPH oxidase na
linhagem eosinófila humana / Juan Álvaro López Quintero. Campinas,
SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Antonio Condino-Neto
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Eosinófilos. 2. Glicocorticóides. I. Antonio Condino-Neto. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR

Prof. Dr. Antonio Condino-Neto

MEMBROS

Profa. Dra. Lourdes Isaac

Profa. Dra. Heloisa de Araújo Ferreira

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dr. Jose Luiz Donato

Curso de Pós-graduação em Farmacologia

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade Estadual de Campinas.

DATA: Agosto 20 de 2004

DEDICATÓRIA

A mis dos mujeres:

Sofía quien llegó en el mejor momento

Piedad que siempre compartió este sueño y esta aventura

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Antonio Condino, por sua orientação e seu incentivo.

Ao Dr. Pablo Javier Patiño, que acreditou na minha capacidade profissional.

À bióloga Jussara Redher pelo apoio técnico e amizade.

Aos amigos Marcos Luengo Blanco, Péricles Motta, Carolina e André pelo apoio incondicional e a suas respectivas famílias.

À enfermeira Silvana e às biólogas Dulcineia Albuquerque, Ângela Maria de Asis e o Engenheiro Tarcisio Peres pelo apoio técnico.

Aos amigos, do laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação em Pediatria,

À minha família, que a distância, sempre torceram que tudo dar certo.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxi</i>
1 - INTRODUÇÃO.....	35
2 - OBJETIVOS.....	49
2.1 - Objetivo Geral.....	51
2.2 - Objetivos Específicos.....	51
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 - Cultura de células HL-60 clone 15.....	55
3.2 - Atividade NADPH oxidase.....	55
3.3- Efeito do Ácido Butírico ou IFN- γ e TNF- α sobre a atividade NADPH oxidase em células HL-60 clone 15.....	56
3.4 - Ensaio de expressão gênica.....	56
3.4.1 - Caracterização molecular da diferenciação eosinofílica e expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase.....	56
3.4.2 - Quantificação relativa da expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase gp91-phox e p47 phox em células HL-60 clone 15.....	58
3.4.2.1 - Determinação da fase linear da amplificação.....	58

3.4.3 - Ensaio de "Slot Blot".....	59
3.4.4 - Ensaio "Nuclear Run-On".....	61
3.4.5 - PCR em tempo real.....	62
3.5 - Efeito dos glicocorticóides no sistema NADPH oxidase em células HL-60 clone 15.....	64
3.6 - Cultura de leucócitos humanos, provenientes de sangue de cordão umbilical.....	65
3.7 - Estatística.....	65
4 - RESULTADOS.....	67
5 - DISCUSSÃO.....	97
6 - CONCLUSÕES.....	113
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AB	Ácido butírico
BID-1, -2, e -3	“Binding Increased During Differentiation”
C/EBPα	“CCAAT Enhancer Binding Protein α ”
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO₂	Gás carbônico
CYBB	Gene da Subunidade b do citocromo b
dATP	Deoxinucleotídeo trifosfato de Adenina
dCTP	Deoxinucleotídeo trifosfato de Citosina
dTTP	Deoxinucleotídeo trifosfato de Timina
dGTP	Deoxinucleotídeo trifosfato de Guanidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPO	Peroxidase dos eosinófilos
$\alpha^{32}\text{P}$	Fósforo 32 alpha
G-CSF	Fator de crescimento de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócito macrófago
gp91	Glicoproteína, 91 kDa
GR	Receptor de glicocorticóide
HAF-1	“Hematopoietic-Associated Factor”
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução salina de Hanks’

ICAM 1	Molécula de adesão intracelular 1
Iκ	Proteína inibidora
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-3 / rhIL-3	Interleucina-3 / interleucina-3 humana recombinante
IL-4	Interleucina-4
IL-5 / rhIL-5	Interleucina-5 / interleucina-5 humana recombinante
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IT	IFN γ e TNF α
KDa	Quilo Dalton
kb	Quilo base
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MBP	Proteína básica maior
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MMLV-RT	Virus de leucemia mielóide de Maloney
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCF1	Fator citosólico de neutrófilos 1

NF-κB	Fator nuclear kappa B
nt	Nucleotídeo
O₂⁻	Anion superóxido
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKC	Proteína quinase C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
phox	“phagocyte oxidase”
rac	“Ras related C3 Botulin toxin”
rap1A	“Ras related protein 1A”
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA_r	Ácido ribonucleico ribossomal
RPMI	Meio rico para cultura de células de mamíferos originalmente desenvolvido no “Roswell Park Memorial Institute”
ROS	Reativos intermediários do oxigênio
RT	Transcriptase reversa
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Ácido tricloro acético

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
Tabela I - Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a análise por meio de RT-PCR.....	57
Tabela II - Sequência de oligonucleotídeos utilizados no PCR em tempo real....	62
Tabela III - Número absoluto e percentual de células HL-60 clone 15 viáveis, tratadas com ácido butírico (AB) (0,5 mM) por 14 dias.....	69
Tabela IV - Concentrações de oligonucleotídeos utilizadas na amplificação de genes na técnica de PCR em tempo real.....	84

	<i>Pág</i>
Figura 1 - Componentes do sistema NADPH Oxidase.....	38
Figura 2 - Expressão gênica de EPO e MBP.....	70
Figura 3 - Efeito do IFN- γ e TNF- α sobre a expressão gênica de EPO e MBP em células HL-60 clone 15.....	71
Figura 4 - Cinética de Expressão de EPO.....	72
Figura 5 - Efeito do Acido Butírico ou IFN- γ e TNF- α sobre a atividade NADPH oxidase em células HL-60 clone 15.....	73
Figura 6 - Expressão do de gp91-phox em células HL-60 clone 15.....	75
Figura 7 - Fase linear da amplificação dos transcritos da gp91-phox e p47 phox.....	76
Figura 8 - Proporção do controle interno (18S) e do seu competidor.....	77
Figura 9 - Efeito do INF- γ e TNF- α sobre a expressão gênica de gp91-phox.....	78
Figura 10 - Efeito do INF- γ e TNF- α sobre a expressão gênica de p47-phox.....	79
Figura 11 - Ensaio tipo “Slot blot” para gp91-phox e p47-phox em células HL-60 clone 15.....	80
Figura 12 - Ensaio de “nuclear run on” nas células HL-60 clone 15.....	81
Figura 13 - Cinética da expressão gênica de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ e TNF α	83

Figura 14 - Curva representativa para gp91-phox com uma eficiência de 100% na amplificação.....	14
Figura 15 - Curvas de dissociação.....	85
Figura 16 - Curva de amplificação de PCR em tempo real.....	86
Figura 17 - Cinética da expressão gênica de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ e TNF α (PCR em tempo real).....	87
Figura 18 - Efeito da Dexametasona na atividade NADPH oxidase em células HL-60 clone 15.....	88
Figura 19 - Efeito da dexametasona na expressão de gp91-phox em células HL-60 clone 15 diferenciadas com IFN- γ e TNF- α	90
Figura 20 - Viabilidade dos leucócitos do sangue de cordão umbilical.....	91
Figura 21 - Indução de diferenciação dos leucócitos provenientes de sangue de cordão umbilical.....	92
Figura 22 - Características morfológicas dos grânulos eosinofílicos.....	93
Figura 23 - Expressão de MBP em células provenientes de sangue de cordão umbilical.....	94
Figura 24 - Atividade NADPH oxidase dos leucócitos provenientes de sangue de cordão umbilical.....	95
Figura 25 - Expressão de gp91-phox em leucócitos de cordão umbilical diferenciados com IL-5 (200 pM) e IL-3 (350 pM).....	96



RESUMO

O objetivo geral deste projeto foi investigar o desenvolvimento a regulação do sistema NADPH oxidase na linhagem eosinofílica humana. Nos concentramos nos genes *CYBB* que codifica a gp91-phox, componente principal do heterodímero citocromo b e no gene *NCF-1* que codifica a p47-phox. A expressão destes, e de outros genes estreitamente relacionados, é regulada segundo a fase de diferenciação celular, sendo específica de células mielóides.

Nosso estudo baseou-se em dois modelos experimentais. O primeiro desenvolvido a partir de leucócitos derivados de sangue de cordão umbilical, cultivados com citocinas que promovem o crescimento e a diferenciação de eosinófilos, especificamente interleucina-3 (IL-3) e interleucina-5 (IL-5) e o segundo, desenvolvido a partir do clone 15 de células da linhagem HL-60, cultivado previamente em condições alcalinas e posteriormente estimulado com ácido butírico. Em paralelo, utilizamos os mesmos sistemas de diferenciação de eosinófilos, com citocinas que influenciam a função fagocítica, especificamente interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Também estudamos o efeito dos glicocorticóides, em particular a dexametasona sobre a atividade oxidase de células HL-60 clone 15 diferenciadas com citocinas. Examinamos a atividade do sistema NADPH oxidase (por meio da redução do citocromo c especificamente inibida pela superóxido dismutase) e a expressão dos genes que codificam os componentes do sistema NADPH oxidase gp91-phox e p47-phox.

Nossos resultados mostraram que as células HL-60 clone 15 se diferenciam numa linhagem eosinofílica quando tratadas com ácido butírico 0,5 mM, expressando um fenótipo eosinofílico maduro, com capacidade para liberar superóxido em quantidades relevantes. Também demonstramos que a cultura dessas células com IFN- γ e TNF- α é suficiente para induzir sua diferenciação eosinofílica, além de expressar transcritos para os componentes gp91-phox e p47-phox do sistema NADPH oxidase. Verificamos que o ácido butírico, IFN- γ e TNF- α juntos tem a capacidade de aumentar a indução do sistema NADPH oxidase, sugerindo que podem utilizar vias comuns ou distintas para estimular o sistema NADPH oxidase, o qual está relacionado ao estágio de desenvolvimento da diferenciação eosinofílica. Por outro lado, observamos que a dexametasona inibe tanto a atividade NADPH oxidase como a expressão do gene gp91-phox quando administrada antes, mas não após a diferenciação das células HL-60 clone 15 com IFN- γ e TNF- α . Em relação aos

leucócitos derivados do sangue de cordão umbilical cultivados com IL-3 e IL-5, demonstramos que se diferenciam e demonstram características morfológicas similares a eosinófilos maduros, além de apresentar um incremento significativo na liberação de superóxido e expressão gênica de gp91-phox no dia 28 de cultura.

Os estudos pretendem contribuir para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos que regulam o sistema NADPH oxidase fagocítico humano, em específico na linhagem eosinofílica humana.



ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the development and regulation of the NADPH oxidase system in the human eosinophilic lineage. We concentrated our studies in the *CYBB* gene, which encodes the gp91-phox, the main component of the heterodimer cytochrome b and *NCF-1* gene, which encodes the p47-phox protein. The expression of these genes is regulated according to the phase of cellular differentiation, specific of myeloid cells.

Our study was based on two experimental models. The first one, was developed with leukocytes from umbilical cord blood, cultured with cytokines that promote the eosinophilic growing and differentiation, specifically interleukin-3 (IL-3) and interleukin-5 (IL-5) and the second one, was established with HL-60 clone 15 cells, previously cultured in alkaline conditions and later stimulated with butyric acid. In parallel, we used the same systems of eosinophil differentiation, with cytokines that influence the phagocytic function, specifically interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α).

The effects of the glucocorticoids, particularly dexamethasone on the oxidase activity of HL-60 clone 15 cells differentiated with cytokines were also studied. We examined the NADPH oxidase system activity (by means of the reduction of cytochrome c specifically inhibited by superoxide dismutase) and the gene expression of gp91-phox and p47-phox, components of NADPH oxidase system. Our results showed that, the HL-60 clone 15 cells were differentiated in an eosinophilic lineage when were treated with butyric acid 0,5 mM, expressing a mature eosinophils phenotype, able to release superoxide in excellent amounts. We also demonstrated, that the culture of these cells with IFN- γ e TNF- α are sufficient to induce the eosinophilic differentiation, besides expressing transcripts of gp91-phox and p47-phox. We observed that butyric acid, IFN- γ e TNF- α together are able to increase the NADPH oxidase system induction, which suggests that they can use common or distinct pathways to stimulate the NADPH oxidase system, which is related with the phase of eosinophilic differentiation development.

On the other hand, we observed that dexamethasone inhibits the NADPH activity oxidase, as well as gp91-phox gene expression when administered before, but not after HL-60 clone 15 cells differentiation with IFN- γ e TNF- α . Regarding the umbilical cord blood leucocytes

cultured with IL-3 and IL-5, similar morphologic characteristics to that of mature eosinophils were observed, besides presenting a significant increase in superoxide release and expression of gp91-phox gene in day 28 of culture. The studies intend to contribute to the advance of the knowledge on the mechanisms that regulate the human phagocytic NADPH oxidase system, specifically in the human eosinophilic lineage.



1 - INTRODUÇÃO

Sistema NADPH oxidase

Os fagócitos, tais como macrófagos e granulócitos contêm associada à membrana o sistema enzimático NADPH oxidase, que provoca a conhecida explosão respiratória, a qual é um evento importante em muitas situações inflamatórias, caracterizada pela produção do ânion superóxido (O_2^-) e outros reativos intermediários do oxigênio (ROOS, 1996; LACY P et al., 2003) que incluem H_2O_2 e OH^- , responsáveis pela atividade microbicida, tumoricida, e inflamatória (HENDERSON e CHAPPELL, 1996; CHANOCK et al., 1994).

Defeitos na atividade oxidase estão associados à doença granulomatosa crônica, caracterizada por infecções graves, potencialmente letais, que demonstram a importância primária e a relevância clínica dos reativos intermediários do oxigênio, como mecanismo microbicida (CURNUTTE et al., 1994; QUIE, 1993). Entretanto, a geração de reativos intermediários do oxigênio pelos fagócitos, é também motivo de dano tecidual em condições diversas como infecções, lesão isquêmica, artrite, doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes (MCCORD et al., 1994; HALLIWELL, 1995) e podem também contribuir para a indução de mutações e carcinogênese (WISEMAN e HALLIWELL, 1996).

O complexo enzimático responsável pela geração de superóxido forma um sistema de transporte de elétrons trans-membranoso que resulta na oxidação do NADPH na superfície citoplasmática e na geração de superóxido na superfície externa da membrana, a qual se transforma na superfície interna do fagolisossoma, durante a fagocitose. O conhecimento sobre os componentes do sistema NADPH oxidase, seus genes e suas relações estruturais, avançou dramaticamente nos últimos 10 anos. Seus componentes protéicos individuais e seus respectivos genes foram clonados (ROYER-POKORA et al., 1986; VOLPP et al., 1988; NUNOI et al., 1988; LETO et al., 1990; DINAUER et al., 1990) e o estudo da estrutura destas 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., 1988a; JESAITIS et al., 1990) (Figura 1).

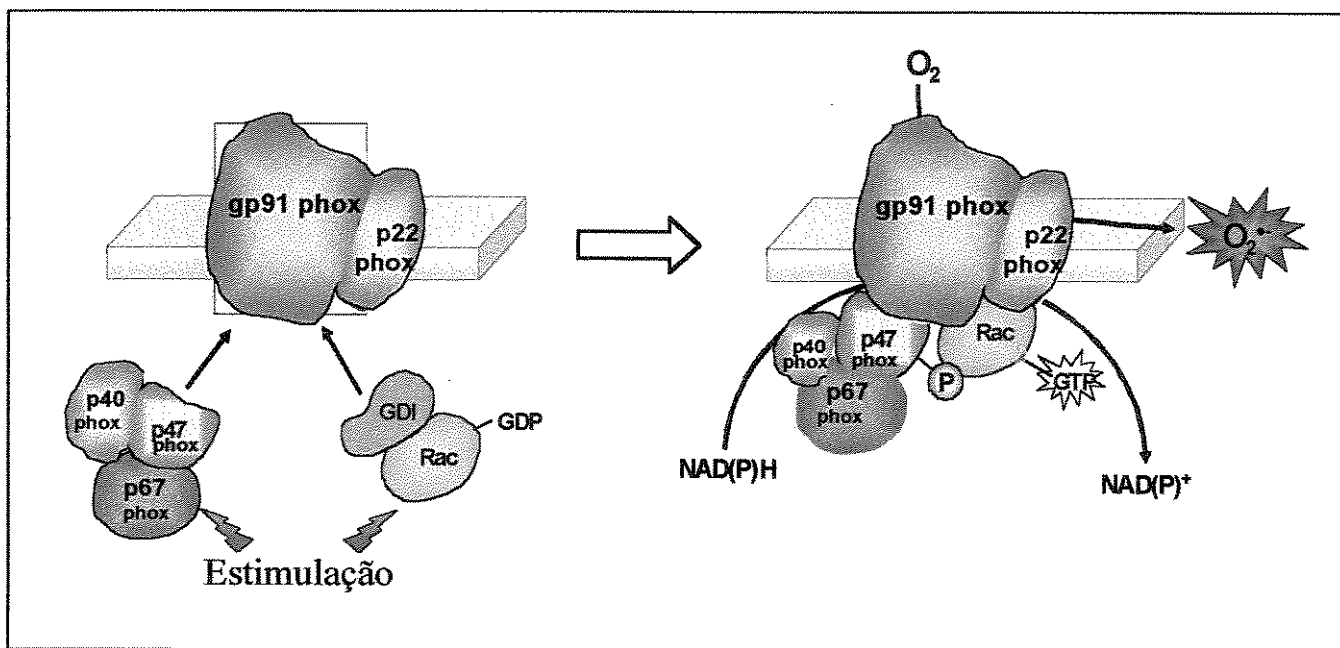


Figura 1 - Componentes do sistema NADPH Oxidase. O flavocitocromo b fagocítico é composto por duas proteínas de membrana, a gp91-phox e a p22-phox. A ativação do sistema NADPH oxidase requer a translocação de subunidades adicionais do citosol para o complexo oxidase na membrana celular, a p47-phox, p67-phox e um novo componente recentemente identificado, a proteína p40-phox, a qual se associa à p67-phox. Nas etapas iniciais de ativação, a p47-phox sofre fosforilação nos resíduos de serina na sequência C-terminal. Duas proteínas G de baixo peso molecular se integram ao sistema NADPH oxidase fagocítico: a proteína rac2 se transloca com os componentes citosólicos; e a rap1, se associa ao componente p22-phox na membrana.

O doador terminal de elétrons ao oxigênio é um flavocitocromo b de baixo potencial (SEGAL et al., 1978; SEGAL e ABO, 1993), localizado primariamente na membrana plasmática (JESAITIS et al., 1990), sendo encontrado nos grânulos secundários (KJELDSEN et al., 1993) e, em menor escala, nas vesículas secretoras. O flavocitocromo b fagocítico é composto por uma glicoproteína de 91 kDa, denominada gp91-phox (glicoproteína, 91 kDa, “phagocyte oxidase”) e um polipeptídeo não glicosilado de 22 kDa,

denominado p22-phox (PARKOS et al., 1987). Os genes que codificam estas proteínas podem sofrer mutações, responsáveis respectivamente pela forma ligada ao sexo e uma das formas autossômicas recessivas da doença granulomatosa crônica (ROOS et al., 1996; CROSS et al., 1996). As subunidades do flavocitocromo b fagocítico do sistema NADPH oxidase foram as primeiras a serem identificadas e seus genes clonados.

A ativação do sistema NADPH oxidase requer a modificação química e translocação de subunidades adicionais do citosol para o complexo oxidase na membrana celular (CURNUTTE et al., 1989; MCPHAIL et al., 1985; BABIOR et al., 1988). Dois destes polipeptídeos com Mr 47 kDa e 67 kDa (p47-phox e p67-phox) foram identificados e seus genes clonados (LETO et al., 1990; LOMAX et al., 1989). Defeitos num destes dois componentes citosólicos respondem pela maioria dos casos de doença granulomatosa crônica autossômica recessiva (VOLPP et al., 1988; ROOS et al., 1996; CROSS et al., 1996). Nas etapas iniciais de ativação, a p47-phox sofre fosforilação em nove resíduos de serina na sequência C-terminal, em particular nos resíduos 303 e 304 (EL BENNA et al., 1994). Duas proteínas G de baixo peso molecular se integram ao sistema NADPH oxidase fagocítico: a proteína rac2 se transloca com os componentes citosólicos; 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; KNAUS et al., 1995). Um novo componente citosólico foi recentemente 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 (Figura 1).

Os estudos sobre a especificidade tissular e expressão dos genes que codificam as duas cadeias do flavocitocromo b, revelaram que o gene gp91-phox se expressa predominantemente nos fagócitos, e o gene p22-phox se expressa constitutivamente em várias outras linhagens celulares (ROYER-POKORA et al., 1986; PARKOS et al., 1988b). Entretanto, os dois genes são induzidos paralelamente por várias citocinas, principalmente pelo interferon-gama (IFN- γ), nos monócitos/macrófagos e granulócitos

(NEWBURGER et al., 1988; NEWBURGER et al., 1991). O IFN- γ também aumenta a expressão do gene gp91-phox em fagócitos de pacientes com doença granulomatosa crônica ligada ao X (EZEKOWITZ et al., 1987). Este achado propiciou, em parte, a base para o uso clínico do IFN- γ para a prevenção de infecções em pacientes com doença granulomatosa crônica (The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group, 1991; MARGOLIS et al., 1990; WEENING et al., 1985), embora os mecanismos de ação do IFN- γ ainda não estejam totalmente esclarecidos (WOODMAN et al., 1992). Recentemente, demonstramos que o IFN- γ corrige parcialmente o fenótipo de uma forma variante de doença granulomatosa crônica ligada ao sexo, corrigindo o erro de "splicing" no primeiro íntron do gene *CYBB* e aumentar a exportação nuclear de transcritos estáveis deste gene para o citoplasma (CONDINO-NETO e NEWBURGER, 2000), observação corroborada por ISHIBASHI et al. (2001) em outro caso similar.

O gene *CYBB* que codifica o componente gp91-phox da NADPH oxidase, 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 éxons, 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 inicial 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, como elastase do neutrófilo (SRIKANTH e 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 à 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-alfa (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 sub população de células com função 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 de regulação de transcrição, denominado HAF-1 (“Hematopoietic-Associated Factor”), restrito às células hematopoéticas e necessário, mas não suficiente, para a indução do gene gp91-phox pelo IFN- γ (EKLUND e SKALNIK, 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 (“Binding Increased During Differentiation”) -1, -2, e -3. 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-FURGA et al., 1989). Estudos posteriores demonstraram quatro sítios de ligação para a proteína que desloca o elemento CCAAT, cada um inibindo a ligação e ativação transcricional de CP1 ou um dos fatores BID (LUO, 1996 e SKALNIK, 1991). Tais estudos contribuíram para o avanço do conhecimento sobre mecanismos transcricionais na linhagem mielocítica humana.

O gene que codifica a proteína p47-phox está localizado no cromossomo 7q11.23, tem 18 kb e 9 éxons, seu RNAm codifica uma proteína de 390 aminoácidos e 44,6 kDa (FRANCKE et al., 1990), que funciona como uma plataforma ao promover o acoplamento das demais proteínas citoplasmáticas no citocromo b₅₅₈, localizado na membrana. Sua fosforilação é promovida principalmente pela proteína quinase C (PKC), com a mudança de sua conformação iniciam a ativação da oxidase, sendo que, a quantidade de proteínas fosforiladas indica o estado de ativação do sistema (NASMITH et al., 1989; GRINSTEIN e FURUYA, 1991).

Eosinófilos

Os eosinófilos são granulócitos terminais diferenciados, oriundos da medula óssea, têm formato polimórfico, núcleo bilobulado, com grande mobilidade, inúmeras vesículas cito-plasmáticas e com distribuição predominante intravascular, nos tecidos mucosos. A vida média dos eosinófilos, acredita-se que é superior à dos neutrófilos, aproximadamente 13 dias, sendo seis dias em desenvolvimento na medula óssea, um dia na circulação e seis dias no tecido. Os níveis sangüíneos sofrem variações durante o dia, atingindo maior concentração à meia-noite e menor concentração ao meio-dia (RIOS e CARVALHO, 1995; TRIGGIANI et al., 2000). Na circulação, constituem 1-3% do total das células brancas do sangue, sendo que há aproximadamente 500 vezes mais eosinófilos nos tecidos que no sangue (DAHL R et al., 1992). Estão fisiologicamente envolvidos nos mecanismos de defesa contra helmintos, citotoxicidade contra tumores e nos processos de cicatrização (WELLER, 1994). Na ausência de parasitas, os eosinófilos ativados podem causar destruição do tecido e ampliar a cascata inflamatória produzindo agentes quimiotáticos, como RANTES, eotaxinas e PAF, que aceleram o recrutamento de novos eosinófilos para o foco inflamatório. Várias doenças inflamatórias estão associadas com eosinofilia. Por exemplo; asma, rinite alérgica, doença atópica da pele, síndrome hiper eosinofílica idiopática (HES), etc (LAMPINEN et al., 2004). Como célula efetora, os eosinófilos têm a capacidade de fagocitar bactérias e liberar mediadores lipídicos, porém seus principais mecanismos de destruição são a liberação de proteínas tóxicas dos grânulos e a produção de radicais livres do oxigênio, tais como superóxido, peróxido de hidrogênio, cloraminas e radical hidroxila, que também podem levar ao dano tecidual (HUA, 2000; LAMPINEN et al., 2004). Entre as proteínas dos grânulos dos eosinófilos, encontram-se a proteína básica principal (MBP), componente dos grânulos eosinofílicos, a proteína catiônica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) e a peroxidase dos eosinófilos (EPO), outra proteína unicamente encontrada nos eosinófilos (grânulos primários) é a proteína lisofosfolipase que forma os chamados cristais bipiramidais hexagonais de Charcot-Leyden encontrados no escarro (TRIGGIANI et al., 2000).

Quando os eosinófilos chegam ao sítio inflamatório sofrem apoptose e são rapidamente retirados pelos macrófagos, sobrevivendo por menos de 48 horas. Algumas citocinas, como IL-3, IL-5 e GM-CSF, retardam a apoptose dos eosinófilos, que sobrevivem por um mínimo de 12 a 14 dias (KANKAANRANTA et al., 2000). Vários outros fatores parecem regular a apoptose dos eosinófilos como por exemplo, membros da família de genes Bcl-2. Enquanto que Bcl-2, Bcl-x₁ e A1 suprimem a apoptose, o Bax, Bcl-x_s, Bad, Bak, Bik são pró-apoptóticas. Pacientes com eosinofilia expressam Bcl-2 nos eosinófilos do sangue periférico (VIGNOLA, 1999). Outro fator regulador da apoptose é o receptor Fas expresso na superfície dos eosinófilos. Este receptor Fas, também chamado APO-1 ou CD95, induz a apoptose. Pacientes com eosinofilia não expressam estes receptores na sua superfície (VIGNOLA, 1999). IFN- γ e TNF- α também incrementam a expressão do CD95, causando um aumento na apoptose mediada por FasL dos eosinófilos *in vitro*. (LUTTMANN, 2000). O óxido nítrico parece evitar a morte induzida pelo receptor Fas em eosinófilos humanos. Pacientes com rinite e asma apresentam aumento de óxido nítrico exalado, favorecendo a eosinofilia (RESNIK, M.B e WELLER, 1993).

Em anos recentes, tem sido encontrado que algumas citocinas podem ser sintetizadas, guardadas e liberadas pelos eosinófilos humanos. O que sugere que os eosinófilos podem regular a inflamação alérgica de uma forma muito mais complexa que só liberando proteínas que afetam o tecido. Por exemplo, um marcado acúmulo de eosinófilos ocorre em várias desordenes importantes como nas doenças alérgicas, infecções parasitárias e no câncer. Em certas doenças, entretanto, pode seletivamente ocorrer um acúmulo de eosinófilo no sangue periférico e em alguns tecidos do corpo, e este depósito anormal pode levar a vários efeitos clínicos (ROTHENBERG, 1998). Eosinofilia no sangue periférico e no escarro é indicativo de asma alérgica e não alérgica. Recentes informações sugerem que o eosinófilo pode ter um papel chave na asma quanto ao dano do epitélio respiratório, devido à elaboração de leucotrieno C que é um potente constritor na via aérea humana. Hiper-reatividade brônquica e inflamação eosinofílica da via aérea, são importantes características da asma (KAY, 2001). Recente investigação sobre o papel da inflamação na asma tem focalizado várias citocinas e mediadores da inflamação na patogênese da doença *in vivo*. De esta forma a liberação de citocinas inflamatórias poderiam amplificar e prolongar a resposta alérgica incrementando o dano no tecido (LAMPINEN, 2004).

Particular interesse tem sido dado ao estudo da IL-5 devido a sua eminente importância no controle da função do eosinófilo. Experimentos *in vitro*, têm demonstrado que a IL-5, aumenta a adesão do eosinófilo na célula epitelial, aumenta o número de eosinófilos remanescentes, estimula a eosinopoiese e aumenta a atividade citotóxica do eosinófilo (COLLINS et al., 1995). Existe uma forte evidência do papel da IL-5 na asma, esta citocina, é essencial no mecanismo de maturação do precursor do eosinófilo na medula óssea e estes eosinófilos se acumulam no pulmão durante um processo inflamatório pulmonar. A inibição da ação da IL-5 mostrou, entretanto um bloqueio na maturação do precursor do eosinófilo (EGAN et al., 1997).

Os eosinófilos tem sido referidos na síntese e armazenamento de uma série de proteínas reguladoras em seus grânulos secretores (eosinas). Estes mediadores são citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (LACY e MOQBEL, 1997). Acredita-se, então que os eosinófilos têm um importante papel nas respostas inflamatórias das vias aéreas, e a eosinofilia do tecido é uma característica da via aérea de asmáticos, portanto, os eosinófilos tem sido demonstrado como causadores da injúria da mucosa e provavelmente contribuem para alterações fisiológicas do pulmão. Está pobremente definido o mecanismo pelo qual se dá o início e a manutenção da inflamação em vias aéreas de pessoas alérgicas. Recentes estudos tem acrescentado o papel das quimiocinas e receptores das quimiocinas na geração da resposta inflamatória eosinofílica e não eosinofílica da via aérea. Interessantemente, a imunorreatividade de várias destas eotaxinas tem sido descobertas para co-localizar os grânulos secretores dos eosinófilos. A potencial habilidade dos eosinófilos em produzir estas moléculas tem levado a uma fundamental reavaliação do papel destas células na regulação das reações inflamatórias em doenças atópicas e parasitárias (LACY et al., 2003).

NADPH Oxidase e eosinófilos

Como em outros fagócitos, a geração de reativos intermediários do oxigênio pelos eosinófilos segue a ativação e acoplamento do sistema NADPH oxidase sobre a membrana plasmática. (BOLSCHER, 1990; HUA, 2001). Estudos sobre sistema NADPH

oxidase dos eosinófilos mostram fortes semelhanças entre eosinófilos e neutrófilos tanto na ativação como na união deste complexo, por exemplo, os eosinófilos podem gerar até 10 vezes mais O_2^- do que os neutrófilos, o qual pode ser causado pela elevada expressão do sistema NADPH oxidase nos eosinófilos (SOMEYA et al., 1997). Outros estudos usando análise por imunoblot, igualmente demonstraram que os eosinófilos produzem mais NADPH oxidase do que os neutrófilos (YAGISAWA, 1996). Esta discrepância na produção do O_2^- entre eosinófilos e neutrófilos pode também ser devida a que na destruição dos microorganismos os neutrófilos geram preferencialmente O_2^- dentro das células (KOBAYASHI, 1998), fato que foi demonstrado em vários experimentos usando DHR-123 (HENDERSON e CHAPPELL, 1993), também, LACY et al. (2003) reportaram que os eosinófilos se unem à NADPH oxidase na membrana plasmática para gerar O_2^- extracelular. Por outro lado, é interessante, que os eosinófilos são capazes de fagocitar *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, porém são incapazes de destruir tão eficientemente quanto os neutrófilos (DECHATELET, 1978). Isto possivelmente devido a que os eosinófilos podem ser menos eficientes na destruição, por falta de uma produção significativa de O_2^- intracelular.

No momento, pouco se sabe sobre os mecanismos de transdução que regulam a ativação da NADPH oxidase na linhagem eosinofílica (LINDSAY e GIEMBYCZ, 1997). Propõe-se que a atividade NADPH oxidase esteja regulada pelo menos em parte, ao nível da expressão gênica em neutrófilos (HUA et al., 2000), e que os componentes do sistema NADPH oxidase estejam expressos após os estágios mielóides durante a maturação eosinofílica (HUA et al., 2001). Supondo que a expressão dos componentes do sistema oxidase em eosinófilos e neutrófilos sigam um padrão similar, espera-se que fatores de transcrição comuns estejam envolvidos nesta expressão (HUA et al., 2001). Contudo, pouco se sabe sobre a regulação da expressão dos genes que codificam os diversos componentes do sistema NADPH oxidase de eosinófilos humanos, um dos objetivos do presente estudo.

Vários modelos têm sido utilizados para estudar os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento e a diferenciação de eosinófilos. Um deles é o cultivo de leucócitos humanos a partir de sangue de cordão umbilical na presença de IL-3 e IL-5,

promovendo sua diferenciação em eosinófilos (ZARDINI et al., 1997). Outro modelo bem caracterizado é o "clone 15" da linhagem celular HL-60 (FISCHKOFF, 1988). Pode-se induzir sua diferenciação *in vitro* para diferentes tipos celulares, com capacidade bioquímica, histológica e funcional de leucócitos maduros; estes incluem células similares a neutrófilos humanos maduros, macrófagos, monócitos ou eosinófilos (COLLINS, 1987). Quando o clone 15 de HL-60 é estimulado com ácido butírico, diferencia-se em células com características similares a eosinófilos maduros, incluindo a habilidade para responder a estímulos quimiotáticos específicos, expressão de receptores de superfície para IL-5 (PLAETINCK, 1990) e expressar proteínas características, como peroxidase (EPO) e proteína básica principal (MBP) (ROSENBERG, 1996). Também se propõe que o ácido butírico tem a habilidade de induzir receptores específicos para certos fatores de crescimento hematopoiéticos em células HL-60. Vários investigadores sugerem que o ácido butírico atua na transcrição gênica, chegando a pré-acometê-las à maturação (PLAETINCK, 1990).

Glicocorticóides

Os glicocorticóides bloqueiam o processo de inflamação, suprimem a ativação do sistema imune e atuam como agentes inibidores do crescimento, *in vitro* e *in vivo*, porém seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido. São empregados na terapia aguda e crônica de diversas doenças imunes, como asma e artrite reumatóide, em quimioterapia de neoplasmas linfóides, por causarem apoptose nessas células, e, ainda, como imunossuppressores, na prevenção da rejeição celular/tecidual após transplante de órgãos e participam do controle da proliferação celular através da regulação de diversos genes ligados ao crescimento e à diferenciação celular, tendendo a promover diferenciação e inibir proliferação. O efeito transcricional dos glicocorticóides se processa através do receptor de glicocorticóide (GR) no tecido alvo, uma proteína intracelular pertencente à superfamília de receptores de hormônios esteróides. Seus efeitos podem ser notados após algumas horas, isto porque sua farmacodinâmica implica em alterações na expressão gênica e síntese protéica (ADCOCK, 2000).

Entretanto, os glicocorticóides podem causar a redução do número de eosinófilos na circulação (SCHLEIMER, 1993) e esta redução é dependente, pelo menos em parte, da supressão de citocinas através da inibição do NF- κ B (ADCOCK e ITO, 2000) e da indução de apoptose nos eosinófilos (MEAGHER et al., 1996). O tratamento com glicocorticóides pode levar a um incremento nos níveis de IL-12 que também promove a apoptose dos eosinófilos (Nutku, 2001). O efeito dos glicocorticóides na atividade NADPH oxidase e expressão dos genes componentes deste sistema, quando administrado antes ou após da diferenciação com citocinas, é um dos objetivos deste projeto.



2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Investigar o desenvolvimento e a regulação do sistema NADPH oxidase na linhagem eosinofílica humana. Focalizamos os genes *CYBB* e *NCF1* que codificam respectivamente as proteínas gp91-phox e p47-phox do sistema NADPH oxidase.

2.2 - Objetivos Específicos

Examinar o padrão de expressão dos genes que codificam as proteínas gp91-phox e p47-phox, durante a diferenciação das células HL-60 clone 15 com ácido butírico e citocinas que influenciam as funções fagocitárias como IFN- γ e TNF- α .

Estudar o efeito dos glicocorticóides sobre sistema NADPH oxidase em células HL-60 clone 15.

Estudar em leucócitos de sangue de cordão umbilical humano, o efeito de citocinas que promovem o crescimento e diferenciação de eosinófilos, especificamente com IL-5 e IL-3 e examinar a atividade NADPH oxidase nestas células.



3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Cultura de células HL-60 clone 15

A linhagem celular promielocítica humana HL-60 clone 15, previamente cultivada e clonada em condições alcalinas, obtida da "American Type Culture Collection", foi cultivada em meio RPMI 1640, contendo soro bovino fetal (10% v/v), L-glutamina (2 Mm), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), e 0,5 mM de ácido butírico, numa densidade de $0,5-1,0 \times 10^6$ células/ml, a 37°C, em atmosfera úmida, saturada com 5% de CO₂, durante 7 dias ou mais (FISHKOFF et al., 1988; ROSENBERG, 1996), ocasião em que foram feitas as contagens absoluta e diferencial, assim como a determinação da viabilidade celular por exclusão com azul de tripan.

3.2 - Atividade NADPH oxidase

A liberação de superóxido foi quantificada espectrofotometricamente utilizando-se o ensaio da redução do citocromo C especificamente inibida pela superóxido dismutase (SOD) (MCCORD e FRIDOVICH, 1969). Utilizamos o ativador solúvel da proteína quinase c (PKC), 4β-forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) como agonista do sistema NADPH oxidase nos experimentos que quantificaram a liberação de superóxido. No dia do experimento, as células foram transferidas para placas de poliestireno com 6 poços (10^6 células por poço) e centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Seu sobrenadante foi substituído por solução salina de Hanks' (HBSS) sem vermelho de fenol, contendo citocromo c (50 µM) e o PMA (30 nM). Metade dos poços receberam SOD (60 U/ml) no início do experimento. Após a incubação, as placas foram colocadas sobre gelo e a outra metade dos poços receberam SOD (60 U/ml). A absorbância do sobrenadante foi monitorizada no comprimento de onda de 550 nm, e a quantidade de superóxido liberada, foi calculada usando-se o coeficiente de extinção de $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A contagem e determinação da viabilidade das células foram feitas antes do experimento e os resultados foram expressos como nmoles de superóxido liberados por 10^6 células por hora.

3.3 - Efeito do Ácido Butírico ou IFN- γ e TNF- α sobre a atividade NADPH oxidase em células HL-60 clone 15

As células HL-60 clone 15 foram cultivadas em placas de poliestireno com 6 poços ($2,0 \times 10^6$ células por poço). No dia do experimento, a liberação de superóxido foi quantificada de acordo com o seguinte protocolo (MCCORD e FRIDOVICH, 1969):

1. Células HL-60 clone 15 cultivadas em condições basais (controle).
2. Células HL-60 clone 15 cultivadas com ácido butírico (0.5 mM) por 2, 5 e 7 dias.
3. Células HL-60 clone 15 cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) por 2 dias.
4. Células HL-60 clone 15 cultivadas com ácido butírico por 5 e 7 dias associadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante as últimas 48 horas.

3.4 - Ensaios de expressão gênica

Nos ensaios seguintes passamos a estudar a diferenciação eosinofílica e o desenvolvimento da NADPH oxidase do ponto de vista molecular, analisando a expressão de genes de proteínas específicas dos eosinófilos, assim como dos genes que codificam componentes do sistema NADPH oxidase.

3.4.1 - Caracterização molecular da diferenciação eosinofílica e expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase

A análise por RT-PCR foi usada para investigar a expressão gênica de duas proteínas específicas dos eosinófilos: peroxidase dos eosinófilos (EPO) e a proteína básica principal (MBP), (COLLINS, 1987), além dos genes *CYBB* e *NCF-1* que codificam respectivamente as proteínas gp91-phox (ROYER-POKORA et al., 1986) e p47-phox (LOMAX et al., 1989) do sistema NADPH oxidase. Esta análise foi considerada nas células HL-60 clone 15 e em leucócitos do cordão umbilical.

O RNA total foi extraído usando o método da guanidina HCl (GINSBURG, 1985). O cDNA foi sintetizado utilizando a enzima SuperScript II RT do vírus de leucemia mieloide de Moloney (MMLV-RT) (GIBCO BRL). Resumidamente, 2µg do RNA total foram adicionados numa solução contendo os seguintes reagentes nas concentrações finais: hexâmeros randômicos (5µM), tampão RT (Tris-HCl 10mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl 1mM); dATP, dCTP, dTTP, dGTP (500µM de cada), enzima M-MuLV-RT (5 U/µl) e inibidor de RNase (0,5U/µl), incubados por 60 minutos a 42°C e a seguir aquecidos por 10 minutos a 92°C. Os cDNAs resultantes foram congelados a -20°C para posterior uso na PCR.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita utilizando-se como substrato 2µl do cDNA produto da RT e 30 ciclos de amplificação, num volume final de 25µl, e adicionados os seguintes reagentes com as concentrações finais: tampão PCR (20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl); dATP, dCTP, dTTP, dGTP (200µM de cada), MgCl₂ (1,5mM), oligonucleotídeos (400nM do “forward” e do “reverse”) específicos para cada gene estudado (Tabela 1), Taq DNA polimerase recombinante e água livre de nucleases. Os produtos da amplificação do cDNA obtidos como descrito acima, foram resolvidos em gel de agarose a 1,5 % no tampão TAE, na presença de brometo de etídeo 1µg/ml. A expressão gênica relativa foi analisada pelo Image Master Software (Biotech Pharmacy).

Tabela I. - Oligonucleotídeos usados para a análise por meio de RT-PCR

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos	Gene Bank
EPO F	5' GCA TCT GCT CCC AGC CCT 3'	M29904
EPO R	5' GAA GGG TCC GGA CCG CTG 3'	M29905
MBP F	5' AGT GGT GGG CAT CCC TGG 3'	M34462
MBP R	5' GGC CAC GCA GTG ACC ACC 3'	
p47-phox R	5' CTGTC GCGGT ACTCT TGCCA TCTTT GGC 3'	NM 000265
p47-phox F	5' GCGCT TCGTA CCCAG CCAGC ACTAT GT 3'	
gp91-phox F	5' GCTCT AGAG C ATGAG GGG CT CTCCA TT TTT GTC A 3'	NM 000397
gp91-phox R	5' CGGGA TCCCG AGTTC AGAGA GTGCT ACTGA ATAA 3'	
β-actina F	5' GCT CGT CGT CGA CAA CGGCTC 3'	NM001101
β-actina R	5' CAAAC ATGAT CTGGG TCATCT TCT C 3'	

3.4.2 - Quantificação relativa da expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase gp91-phox e p47 phox em células HL-60 clone 15

Foi utilizado o kit comercial QuantumRNA 18S Internal Standards (Ambion, Inc., TX), para a quantificação relativa da expressão dos genes que codificam as proteínas gp91-phox e p47-phox. Esta técnica utiliza dois pares de oligonucleotídeos iniciadores em cada reação, um para amplificar o cDNA de interesse e outro para amplificar o controle interno (RNAr 18S). No entanto, como o controle interno utilizado é abundante, é importante que a eficiência da amplificação do controle interno (18S) esteja sendo observada na mesma intensidade da amostra alvo. Este sistema utiliza-se de um limitador (competímero) que modula a eficiência de amplificação do controle interno, que consiste de um oligonucleotídeo modificado em seu extremo 3', o qual bloqueia parcialmente a extensão pela DNA polimerase, quando adicionado na reação do controle interno na devida proporção, permitindo a comparação da amplificação na mesma faixa de variabilidade linear (PALLANSCH, 1990).

Para a avaliação da expressão relativa dos genes que codificam as proteínas gp91-phox e p47-phox, utilizamos as células HL-60 clone 15 cultivadas conforme o seguinte protocolo:

1. Condições basais (controle).
2. IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) por 2 dias.
3. Ácido butírico (0.5 mM) por 5 dias.
4. Ácido butírico por 5 dias associadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante as últimas 48 horas.

3.4.2.1 - Determinação da fase linear da amplificação

Considerando que durante o ensaio de PCR, a reação permanece linear por um limitado número de ciclos, é necessário determinar esta faixa de ciclos para todos os produtos do PCR que estão sendo medidos. Os reagentes para a PCR foram dispostos em 6

tubos de reação iguais e retirados do termociclador nos ciclos de número 22, 24, 26, 28, 30 e 32, nos quais a eficiência da amplificação é progressiva, até atingir valores máximos e constantes.

Os produtos da amplificação dos cDNAs de gp91-phox, p47 phox e o controle interno (RNAr 18S), foram resolvidos em gel de agarose a 2,0 % no tampão TAE, na presença de brometo de etídeo 1µg/ml. A expressão gênica relativa foi analisada pelo Image Master Software (Amersham Pharmacia Biotech). O resultado da densitometria das amostras alvo foi dividido pelo resultado da densitometria das amostras do controle interno, normalizando uma razão, que foi considerada para a análise estatística.

3.4.3 - Ensaio de “Slot Blot”

Esta metodologia é usada para determinar os níveis estáveis do RNAm de um gene específico. Os experimentos “slot blot” foram realizados conforme instruções do fabricante Schleiner & Schuell, para seu equipamento Minifold II. Estudamos os genes *CYBB* e *NCF-1*. Utilizamos as células HL-60 clone15 conforme especificado a seguir:

1. Condições basais (controle).
2. IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) por 2 dias.
3. Ácido butírico por 5 dias
4. Ácido butírico por 5 dias associadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante as últimas 48 horas..

Os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando 5µg de RNA para cada amostra, diluído em 100µl de água livre de nucleases, adicionando 300µl de uma solução 1/1 de 37% de formaldeído e 20X SSC. As amostras de RNA neste tampão foram aquecidas a 65° C por 15 minutos, em seguida colocadas no gelo e adicionado 55µl de uma solução de acetato de amônia a 4M pH 7. A membrana de nitrocelulose foi pré-hidratada com solução 10X SSC, colocando-se em cada poço 500µl de solução 10X SSC, seguida da

amostra de RNA e novamente 500µl de solução 10X SSC, aplicando-se vácuo ao sistema. Em seguida, o RNA foi fixado à membrana de nitrocelulose por aquecimento em forno a vácuo por 2 horas a 80 ° C. A membrana foi então pré-hibridada em solução contendo 20X SSC, 50X solução de Denhardt, fosfato de sódio 1M (ph 7,0), DNA de espermatozoides de salmão (10mg/ml) e formamida deionizada.

A seguir, a membrana foi hibridada com as sondas cDNA dos genes gp91-phox, p47-phox e 18S amplificadas e marcadas com [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (3000 Ci/mmol). Utilizamos 1×10^7 CPM por sonda. As sondas do gene gp91-phox foram produzidas utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 7F-184 e CGD 10R- 949, com 766 pares de base (entre éxon 3 a 9), por meio de PCR com 30 ciclos, sendo cada ciclo: 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 90 segundos. As sondas do gene p47-phox foram produzidas utilizando-se dos oligonucleotídeos iniciadores p47-48F e p47-451 R, com 404 pares de base, por meio de PCR com 30 ciclos, sendo cada ciclo: 95 ° C por 45 segundos, 60 ° C por 45 segundos, 72 ° C por 90 segundos. As sondas do 18S foram produzidas conforme instruções do fabricante (Ambion, catálogo 1717), com 324 bp. Além dos oligonucleotídeos iniciadores, a solução para PCR foi acrescida das bases dATP, dGTP, dTTP, além de dCTP marcado com [$\alpha^{32}\text{P}$] (3000 Ci/mmol), tampão 10X PCR, MgCl_2 , água livre de nucleases, Taq polimerase, e o molde para gp91-phox e p47-phox. O controle negativo da PCR continha a solução acima, subtraída do template para os respectivos genes, e do [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP. O controle sem radioatividade continha a solução acima, subtraída do [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP.

Para a leitura da radioatividade, o produto do PCR foi diluído em água destilada 1:5, acrescido de TCA 10% e incubado no gelo por 15 minutos. Em seguida, o produto do PCR foi transferido, por mecanismo a vácuo, para um filtro de fibra de vidro Whatman 934-AHL. Por fim, os filtros foram colocados em frascos contendo líquido de cintilação, e a radioatividade foi medida em contador Beta.

O produto do PCR com as sondas cDNA dos genes gp91-phox, p47-phox e 18S marcadas com [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP foi aquecido à 42°C por 10 minutos, e posteriormente colocado em contato com a membrana pré-hibridada, à 42°C por 18 horas. Após a hibridação, os

filtros foram submetidos à lavagem com solução 2x SSC + 0,1% SDS por 15 minutos, e posteriormente com solução 0,2x SSC + 0,1% SDS por 30 minutos. Os filtros foram expostos ao filme Amersham Pharmacia Biotech Hyperfilm MP (código RPN1677K) por 3 dias para gp91-phox e p47-phox, e por 2 horas para 18S. Em seguida, os filmes foram revelados. Analisamos quantitativamente os níveis estáveis de RNA por densitometria utilizando-se do aparelho Image Master Total Lab v1.11. Os níveis de hibridação foram normalizados pelo 18S, gene expresso constitutivamente.

3.4.4 - Ensaio “Nuclear Run-On”

Esta técnica é usada analisar a atividade transcricional de um determinado gene. Portanto, o aumento de um RNA específico reflete sua taxa de transcrição. Com o objetivo de investigar a atividade transcricional dos genes gp91-phox e p47-phox, utilizamos ensaios “nuclear run-on”, sendo as células HL-60 cultivadas numa concentração de $0,5 \times 10^6$ células/ml, conforme protocolo especificado no experimento de “slot blot”:

A atividade transcricional dos genes *CYBB* e *NCF-1* foi estudada segundo metodologia descrita por Greenberg (GREENBERG et al., 1985). Os núcleos viáveis das células HL-60 clone 15 foram isolados por meio de lise celular em Nonidet P-40 (0,05%), e incubados durante 45 minutos, a 30°C, com uma mistura de nucleotídeos contendo [32 P]UTP (250 μ Ci, 3000 Ci/nmol) e adição de 0,8 mM de $MnCl_2$. O RNA sintetizado “*de novo*” foi extraído pelo método da guanidina HCl e precipitado em etanol (SUBRAHMANYAM et al., 1999). O RNA normalizado ($1-2 \times 10^7$ cpm), foi hibridado com sondas de cDNA, imobilizados em filtros de nitrocelulose (“slot blots”). As sondas usadas neste experimento foram cDNAs completos para os genes *CYBB* e *NCF1* (LOMAX et al., 1989), como controles negativo e positivo de hibridação foram usados respectivamente (plasmídeo), e um gene de expressão constitutiva (β -actina) (CONDINO-NETO et al., 1998; DINARELLO, 1991). A atividade transcricional foi analisada e calculada por densitometria das bandas de hibridação utilizando o Image Master Software (Amersham Pharmacia Biotech), e os resultados interpretados semi-quantitativamente.

3.4.5 - PCR em tempo real

Os experimentos que avaliam a expressão gênica foram complementados pela detecção de sua amplificação em tempo real (“Real time PCR”). A técnica, foi baseada no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação em cadeia da polimerase (PCR) na fita recém sintetizada. Foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando o reagente “SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems)”, componente intercalante de DNA dupla-fita, que contem todos os reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (dNTPs, MgCl₂, Tampão, Taq Ampli-Gold)..

Utilizamos a análise relativa dos dados, onde a expressão do gene gp91-phox foi quantificada em relação a um gene de controle endógeno de expressão, a β -actina. A análise relativa dos dados foi expressa pela derivação da fórmula matemática $2^{-\Delta\Delta CT}$, de onde obtivemos os níveis de expressão gênica das amostras sempre em relação à amostra calibradora, como descreve o manual do equipamento. Para a realização desta técnica foram desenhados oligonucleotídeos específicos para o gene gp91-phox, alvo do nosso estudo, e também oligonucleotídeos específicos para o gene utilizado como controle da técnica, a β -actina. Os oligonucleotídeos foram desenhados pelo software “Primer Express” (Applied Biosystems). Os ensaios que avaliam a expressão do gene p47-phox estão na fase de cálculo e serão concluídos no decorrer de julho de 2004. Segue abaixo as seqüências dos oligonucleotídeos (Tabela II):

Tabela II - Seqüência de oligonucleotídeos utilizados no PCR em tempo real.

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos	Gene Bank
gp 91 phox F	5' TTG TGG AAA CCC TCC TAT GA 3'	NM 000397
gp 91 phox R	5 AAA ACC GCA CCA ACC TCT CA 3'	
β -actina F	5' TCA CCG AGC GCG GCT 3'	NM001101
β -actina R	5' TAA TGT CAC GCA CGA TTT CCC 3'	

Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutiva, são necessárias condições ótimas que tenham um 100% de eficiência na amplificação, isto é obtido da fórmula $10^{(-1/\text{slope})}$ (MEIJERINK et al., 2001). Para que essa eficiência seja próxima entre as amostras é importante que os produtos gerados por cada par de oligonucleotídeos também tenham um tamanho aproximado. As otimizações foram feitas através amplificações obtidas de várias concentrações de oligonucleotídeos em uma diluição seriada de cDNA de células HL-60 clone 15 controle. As diluições foram as seguintes: 500ng, 200ng, 50ng, 20ng, 5ng e 2ng.

Todas as amostras foram quantificadas por triplicata em placas de 96 “wells” (MicroAmp Optical 96-well reaction plate -Applied Biosystems). As reações foram realizadas num em um volume total de 25ul contendo 20ng de cDNA, 12,5ul de SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems). As concentrações de oligonucleotídeos utilizados e os tamanhos do produto amplificado estão na tabela IV. Os dados para serem aplicados à forma matemática foram coletados na forma de emissão de fluorescência na fase exponencial da reação pela determinação de um único “Threshold” para todas as amostras realizadas numa mesma placa de 96 “wells”. Este “Threshold” é uma linha traçada na vertical o ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação é denominada “Cycle threshold”, ou “Ct”. Estes dados em forma de “Ct” foram exportados para uma planilha de Excel. Foram extraídas as médias destes e foram feitas as normalizações dos dados com o controle de expressão endógena, o primeiro passo da derivação aritmética denominado ΔCt (Ct da amostra com gene alvo menos Ct da amostra com gene do controle endógeno).

Após a normalização dos dados foi realizada a calibração dos mesmos, utilizando situações onde a expressão do gene alvo é inexistente, levando ao segundo passo da derivação aritmética denominado $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt da amostra a ser quantificada menos ΔCt da amostra calibradora). Os dados que foram normalizados e calibrados foram convertidos em níveis de expressão pela fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$, estima-se que a situação calibradora tem valor “1” (um) de expressão. A seguir passamos a realizar a curva de dissociação gerada pelo equipamento. Esta curva baseasse no “Tm” (Melting Temperature) específica de cada produto, que é determinada pela composição dos nucleotídeos. A cada variação da

temperatura, que acontece entre 60°C à 95°C logo após o término da PCR, são coletados dados de fluorescência. A curva de dissociação se dá quando em determinada temperatura o produto da PCR separa suas fitas e ocorre uma queda de fluorescência gerada pelo SYBR Green, sendo que este intercala somente dupla fita.

Examinamos e comparamos nas células eosinófilicas, o padrão de expressão do gene CYBB, fazendo as mesmas cinéticas de expressão utilizadas para o RT-PCR convencional. As células HL-60 clone 15 foram cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e/ou TNF- α (1000 U/ml) durante 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

3.5 - Efeito dos glicocorticóides no sistema NADPH oxidase em células HL-60 clone 15

Analizamos o efeito da dexametasona sobre o sistema NADPH oxidase de células HL-60 clone 15, antes e após sua diferenciação com citocinas. Inicialmente, analisamos o efeito da dexametasona sobre a liberação de superóxido por meio do o ensaio de redução do citocromo C especificamente inibido pela SOD (McCord & Fridovich, 1969). A seguir, estudamos o efeito da dexametasona sobre a expressão do gene CYBB por meio de PCR quantitativo-relativo. As células HL-60 clone 15 foram cultivadas com IFN- γ , TNF- α e dexametasona segundo os seguintes protocolos:

1. Condições basais (controle).
2. IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) por 48 horas.
3. Dexametasona (1 μ M) por 24 horas.
4. Cultura de 3 dias, sendo dexametasona (1 μ M) por 24 horas e a seguir adicionadas de IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante as últimas 48 horas.
5. Cultura de 3 dias, sendo as primeiras 48 horas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) e as últimas 24 horas com dexametasona (1 μ M).

3.6 - Cultura de leucócitos humanos, provenientes de sangue de cordão umbilical

Para a obtenção dos eosinófilos derivados de sangue de cordão umbilical, modificamos e adaptamos as condições desenvolvidas por (BOYCE et al., 1995). Nossas modificações foram; a não utilização de uma “matrix” extracelular solúvel (Matrigel) sobre a qual cresceriam as células, e o desenho de uma bolsa específica para a coleta de sangue.

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção do cordão umbilical, após a dequitação da placenta proveniente de parto normal ou cesariana sem complicações. O sangue foi fracionado em gradiente de densidade de Ficoll-Paque (1,77 g/ml, 1:1 vol sangue/Ficoll). A seguir, os leucócitos foram cultivados em meio RPMI 1640, contendo soro bovino fetal (10% v/v), β -mercaptoetanol (50 μ M), L-glutamina (2 Mm), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), interleucina-5 humana recombinante (rhIL-5, 200 pM, R&D Systems) e interleucina-3 humana recombinante (rhIL-3, 350 pM, R&D Systems), numa densidade de $0,5-1,0 \times 10^6$ células/ml, em garrafas de cultura a 37°C, em atmosfera úmida, saturada com 5% de CO₂, por período de 28 dias, em condições livres de endotoxina (< 10 pg/ml) (BOYCE et al., 1995; BOYCE et al., 1996). O meio de cultura contendo citocinas foi substituído semanalmente, ocasião em que foram feitas as estimativas da viabilidade celular, as contagens absoluta em hemocítômetro, diferencial, após “cytospin” em lâminas coradas com May-Grunwald. Analisamos a expressão dos genes que codificam a proteína específica da linhagem eosinofílica (MBP), o componente CYBB, além da liberação de superóxido segundo ensaio da redução do citocromo C especificamente inibida pela superóxido dismutase (SOD) (MCCORD e FRIDOVICH, 1969).

3.7 - Estatística

Os dados foram obtidos de pelo menos 4 experimentos diferentes e cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão. O teste de Mann-Whitney foi usado para a comparação entre os grupos e um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo (BHATTACHARYYA, 1977).



4 - RESULTADOS

4.1 - Cultura de Células HL-60 clone 15

Para a diferenciação das células HL-60 clone 15 partimos de uma densidade de $0,5-1,0 \times 10^6$ células/ml e o período de cultura com AB (0,5 mM) foi limitado até o dia 7, sendo avaliada neste período a diferenciação eosinofílica e o desenvolvimento do sistema NADPH oxidase. A viabilidade celular foi monitorizada no dia dos experimentos específicos, sempre se mostrando superior a 85% (n=10), quando comparada às células controle que tiveram uma viabilidade maior de 95% (n=4). A viabilidade das células HL-60 clone 15 cultivadas com ácido butírico (AB) 0,5 mM, diminuiu drasticamente para 25% depois do dia 14 de cultura em comparação às células controle. (Tabela III)

Tabela III - Número absoluto e percentual de células HL-60 clone 15 viáveis, tratadas com ácido butírico (AB) (0,5 mM) por 14 dias.

Dia de Tratamento	Células HL-60 clone 15		Células HL-60 clone 15 + AB	
	Controle n=4		0,5 mM n=10	
	# células x 10^6	% de viabilidade	# células x 10^6	% de viabilidade
0	2,8	> 95	1,98	> 95
7	2,7	> 95	0,85	85 - 95
14	2,5	> 95	0,75	25

4.2 - Caracterização molecular da diferenciação eosinofílica das células HL-60 clone 15

Para demonstrar que existiu uma verdadeira diferenciação eosinofílica em nossos modelos experimentais, identificamos a expressão gênica de duas proteínas específicas de eosinófilos, por meio de RT-PCR. Escolhemos a peroxidase dos eosinófilos (EPO) e a proteína básica principal (MBP) devido a sua expressão constitutiva nesta linhagem (COLLINS, 1987). A Figura 2 demonstra que a expressão gênica de EPO e MBP foi claramente superior nos dias 3 e 7 de cultura das células HL-60 clone 15 com ácido butírico, quando comparada ao dia 1. A expressão gênica de β -actina foi detectada em igual intensidade em todas as amostras analisadas durante cada experimento.

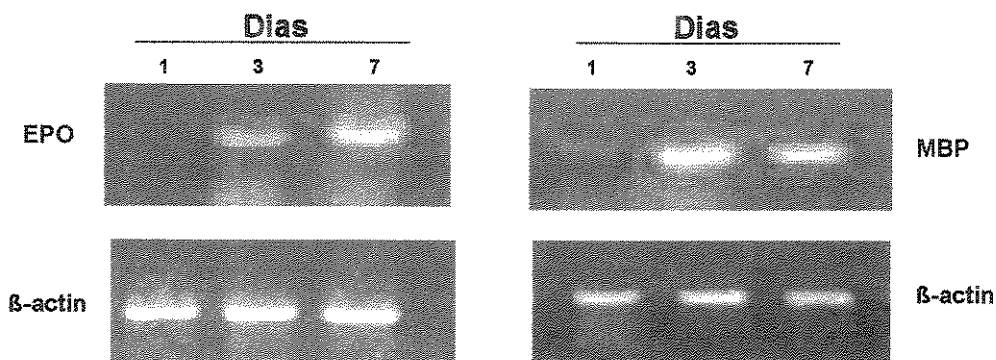


Figura 2 - Expressão gênica de EPO e MBP Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR realizada com oligonucleotídeos para EPO e MBP em células HL-60 clone 15 diferenciadas com (AB) (0,5 mM). A expressão gênica de EPO e MBP foi superior nos dias 3 e 7 de cultura. Células não diferenciadas (pista 1). O produto de β -actina foi detectado em igual intensidade em todas as amostras analisadas.

4.3 - O efeito do IFN- γ e TNF- α sobre a expressão gênica de EPO e MBP em células HL-60 clone 15

A cultura das células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 2 dias ocasionou um aumento na expressão gênica de EPO e MBP comparada com as células controle (Figura 3, $p < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney). Resultados similares foram observados quando estas células foram cultivadas com IL-5 (200 pM) por 7 dias (Figura 3, $p < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney) ou AB (0.5 mM) por 5 dias (Figura 3, $p < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney). Quando IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) foram adicionados durante os dois últimos dias da cultura, a expressão gênica de EPO incrementou nas células HL-60 clone 15 diferenciadas com AB (0.5 mM) por 5 dias, comparada com as células cultivadas somente com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 2 dias ou células em condições basais (Figura 3, $P < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney).

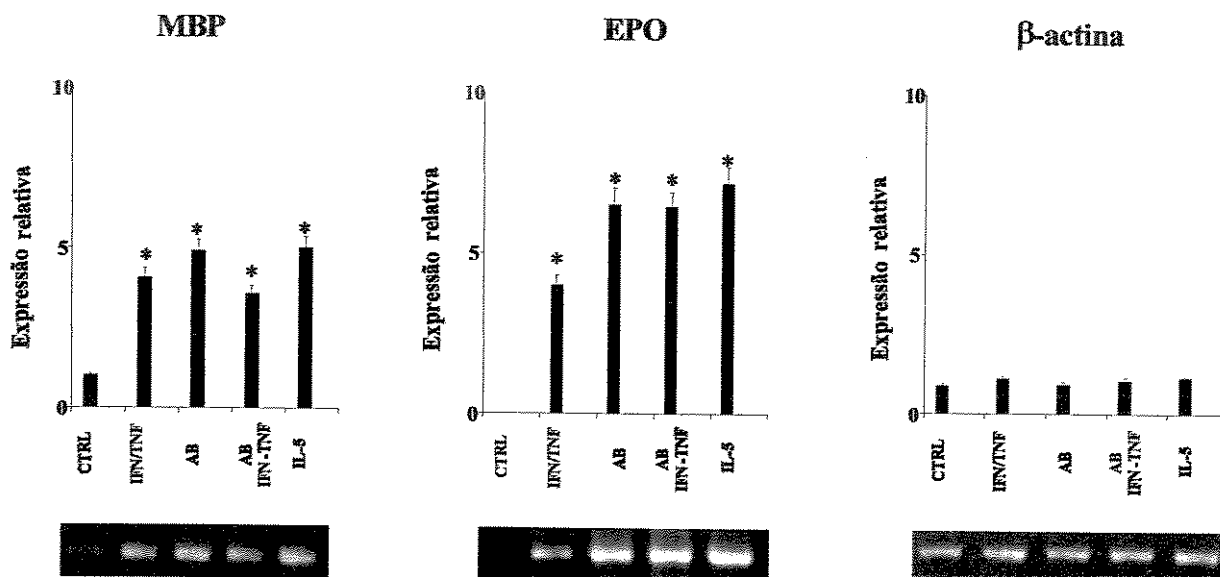


Figura 3 - Efeito do IFN- γ e TNF- α sobre a expressão gênica de EPO e MBP em células HL-60 clone 15. IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) ou IL-5 (200 pM) causaram incremento significativo na expressão gênica de EPO e MBP, comparada às células cultivadas em condições basais. Resultados similares foram observados quando as células foram cultivadas com AB 0.5 mM por 5 dias. A adição de IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante os dois últimos dias da cultura incrementou a expressão gênica de EPO nas células HL-60 clone 15 diferenciadas com AB 0.5 mM (* $p < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney).

4.4 - Cinética da expressão gênica de EPO em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ e TNF- α

Nesta etapa, investigamos em mais detalhe o efeito do IFN- γ e o TNF- α sobre a diferenciação eosinofílica das células HL-60 clone 15. Portanto, fizemos uma cinética de expressão usando oligonucleotídeos específicos para EPO, e estimulando as células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Destacamos um pico de expressão gênica de EPO em 3 e 48 horas nas células HL-60 clone 15 cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) (Figura 4).

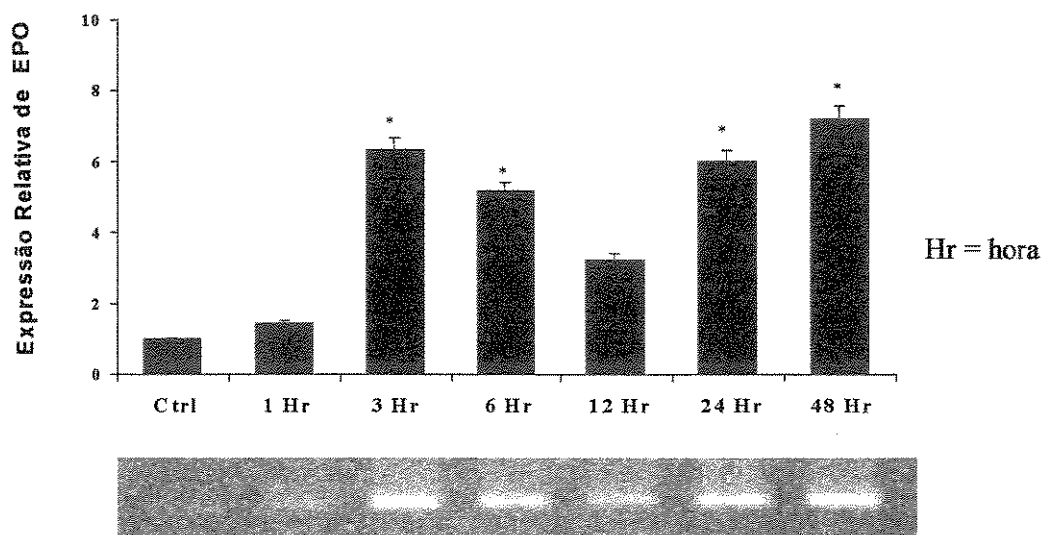


Figura 4 - Cinética de Expressão de EPO. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR realizada com oligonucleotídeos para EPO em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml). Observa-se um aumento na expressão gênica de EPO em 3 e 48 horas. Células não diferenciadas controle (Ctrl) (pista 1). O painel inferior representa a expressão relativa. (* $p < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney).

4.5 - Efeito do Ácido Butírico, IFN- γ e TNF- α sobre a atividade NADPH oxidase em células HL-60 clone 15.

IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) causaram um incremento significativo na liberação de superóxido pelas células HL-60 clone 15 depois de dois dias de cultura, comparadas às células cultivadas em condições basais ou com AB (Figura 5, $p < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney). Estas citocinas por separado também causaram um incremento significativo na liberação de superóxido pelas células HL-60 clone 15 depois de cinco e sete dias de cultura.

A adição de IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante os dois últimos dias da cultura nas células HL-60 clone 15 cultivadas com AB (0,5 mM) por 5 dias causou um aumento significativo na liberação de superóxido (Figura 5, $p < 0,05$, $n = 4$, teste de

Mann-Whitney). O AB (0,5mM) sozinho causou um incremento significativo na liberação de superóxido pelas células HL-60 clone 15 depois de 7 dias quando comparadas com as células cultivadas em condições basais (Figura 5, $p < 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney).

Este aumento não ocorreu quando as células foram cultivadas com AB (0,5 mM) mais IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) por 7 dias (Figura 5, $p > 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney). O IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) ocasionaram uma diminuição dramática na viabilidade das células HL-60 clone 15 depois de 7 dias de cultura, impedindo a realização do ensaio de atividade NADPH oxidase além deste período de cultura.

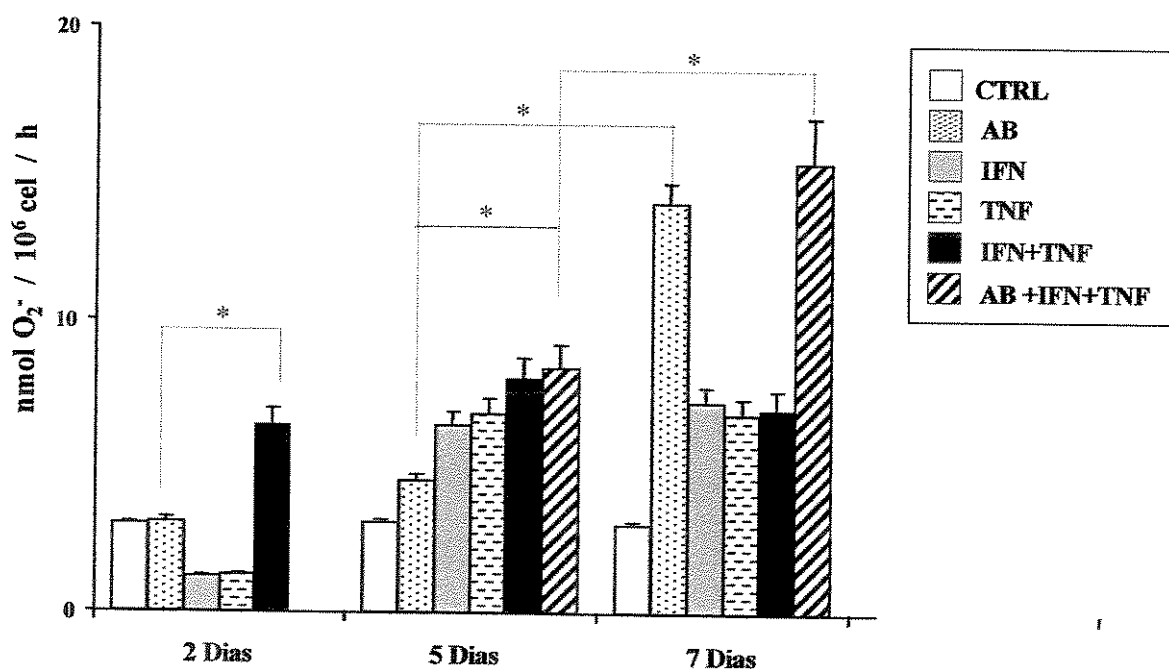


Figura 5 - Efeito do Acido Butírico ou IFN- γ e TNF- α sobre a atividade NADPH oxidase em células HL-60 clone 15. Após 48 de cultura com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) as células HL-60 clone 15 tiveram um incremento significativo na liberação de superóxido. Depois de 5 dias, estas citocinas e / ou o AB (0,5mM) também ocasionaram um incremento significativo na atividade NADPH oxidase. Os histogramas representam a média de 4 experimentos independentes (* $p < 0,005$, teste de Mann Whitney).

4.6 - Expressão gênica do componente gp91-phox em células HL-60 clone 15 segundo RT-PCR convencional

As células diferenciadas com ácido butírico (0,5 mM) por 3 ou 7 dias apresentaram padrão crescente da expressão gênica de gp91-phox, quando comparadas com as células controle (Figura 6, $p < 0,05$ em ambas as situações, $n = 4$, teste de Mann-Whitney). A expressão gênica de gp91-phox foi maior nas células HL-60 clone 15 diferenciadas com AB (0,5 mM) durante 7 dias, quando comparadas às diferenciadas com AB (0,5 mM) durante 3 dias, sem atingir diferença estatisticamente significativa (Figura 6, $p > 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney). A expressão de gp91-phox em células THP-1 cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 48 horas, e células HeLa cultivadas em condições basais foram incluídas como controles positivo e negativo respectivamente.

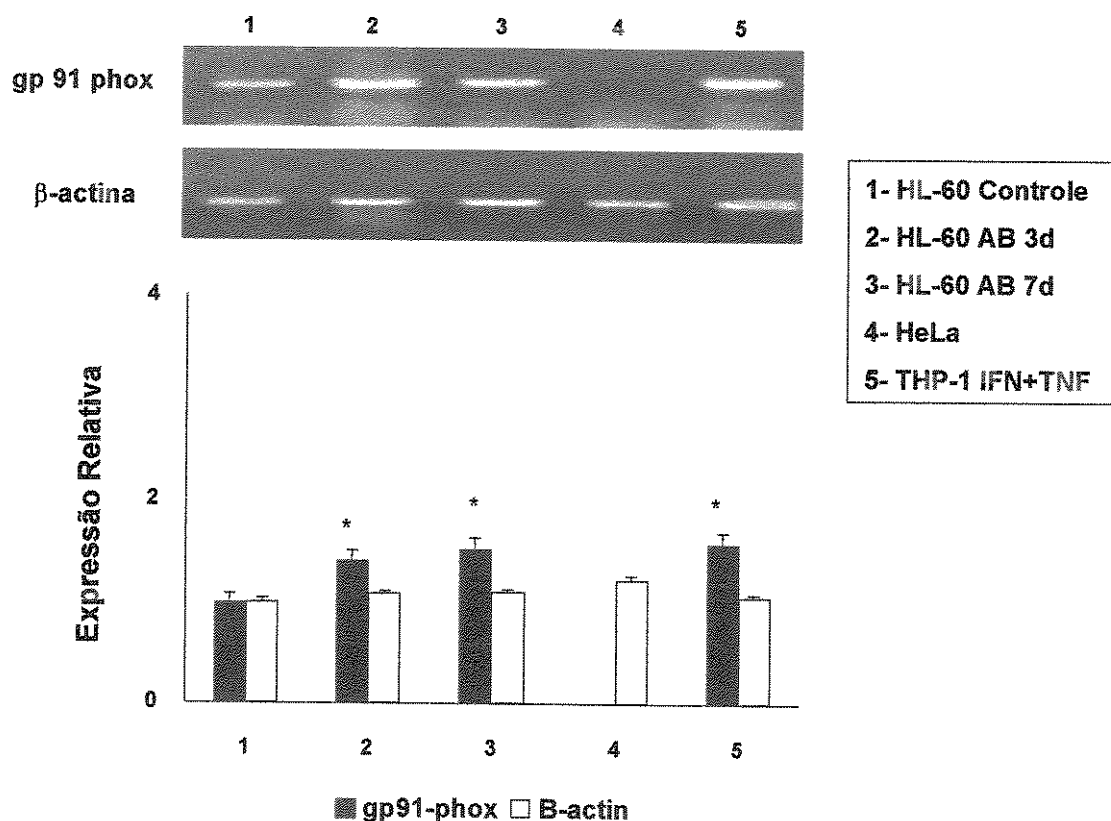


Figura 6 - Expressão de gp91-phox em células HL-60 clone 15. Painel superior; produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos para gp-91 phox e β-actina. Observamos um padrão crescente da expressão do gene que codifica gp91-phox em células HL-60 clone 15 diferenciadas com AB em relação aos respectivos controles. O painel inferior representa a expressão relativa (*P<0,005, teste de Mann Whitney).

4.7 - Quantificação relativa da expressão gênica dos componentes gp91- e p47-phox em células HL-60 clone 15

Foi determinada a fase linear da amplificação dos transcritos da gp 91-phox (exon 1, 32 F -exon 5, 443R com um produto de amplificação de 415pb) e p47-phox (48 F – 451 R, com um produto de amplificação de 404 pb). A Figura 7 exhibe as eletroforeses em gel de agarose 2% dos produtos da amplificação, relativos aos transcritos dos componente gp91-phox (A) e p47 phox (B) em células HL-60 clone 15, corados com brometo de etídeo (1µg/ml), determinando-se que o ciclo 28 (pista 4, nos dois casos) foi o melhor em termos de eficiência de amplificação.

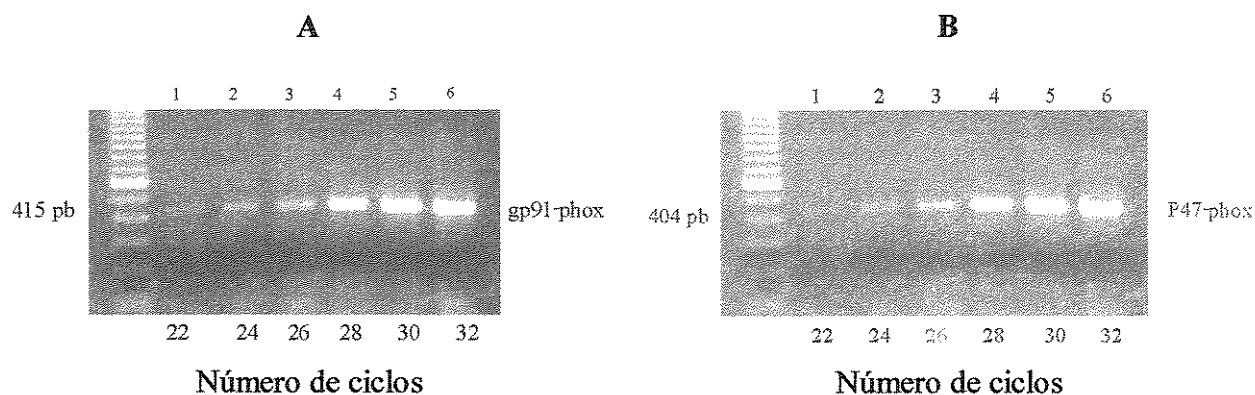


Figura 7 - Fase linear da amplificação dos transcritos da gp91-phox e p47 phox. A fase linear da amplificação determinou que o ciclo 28 (pista 4, nos dois casos) foi o melhor em termos de eficiência de amplificação. Transcritos da gp91-phox (A) e p47 phox (B). Cada pista representa o número de ciclos.

4.7.1 - Proporção do oligonucleotídeo iniciador do controle interno (18S) e do seu competidor.

Determinamos a concentração necessária de oligonucleotídeos competidores para amplificar o controle interno (18S) na mesma variação linear da amostra alvo. A Figura 8 mostra eletroforeses em gel de agarose 2%, coradas com brometo de etídeo (1µg/ml), representativa das proporções de 18S / competidores adicionadas às reações de PCR, que contenham o cDNA das células HL-60 clone 15 e oligonucleotídeos iniciadores da gp91-phox e p47 phox respectivamente. As PCRs geraram produtos de 315 pb (18S) e 415 pb (gp91-phox) e 404 pb (p47-phox), evidenciando que a proporção 2/8 (pista 3 em ambas as situações) entre o 18S e seu competidor foi a mais semelhante e ideal para que a amplificação do controle interno ocorresse na intensidade semelhante à observada na amostra alvo.

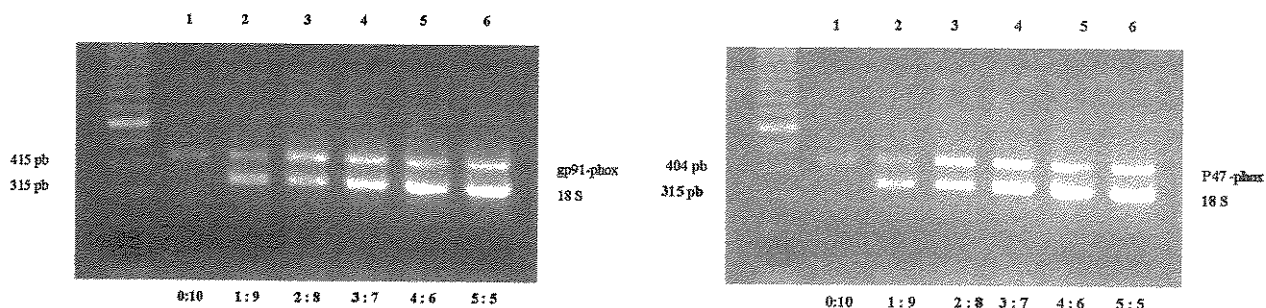


Figura 8 - Proporção do controle interno (18S) e do seu competidor . A eletroforese em gel de agarose 2%, corada com brometo de etídeo (1 μ g/ml), foi usada para determinar a proporção do controle interno (18S) e do seu competidor tanto para gp91-phox como para p47 phox em células HL-60 clone 15. Sendo que a proporção 2/8 (pista 3 em ambas as situações) foi a melhor.

4.8 - Expressão do componente gp91-phox em células HL-60 clone 15, segundo RT-PCR quantitativa / relativa.

A Figura 9 mostra um gráfico representativo da densitometria relativa dos produtos da reação de RT-PCR, usando oligonucleotídeos específicos para o componente gp91-phox do sistema NADPH oxidase (pb=415) e para o 18S (pb=315). A cultura das células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 2 dias ocasionou um incremento significativo na expressão gênica relativa de gp91-phox (Figura 9, $p < 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney). A cultura das células HL-60 clone 15 com AB (0.5 mM) por 5 dias não incrementou a expressão gênica relativa de gp91-phox (Figura 9, $p > 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney). Encontramos que a união de IFN- γ (100 U/ml), TNF- α (1000 U/ml) com o AB, incrementou a expressão gênica relativa de gp91-phox nas células HL-60 clone 15 quando as citocinas foram adicionadas na cultura durante as últimas 48 horas (Figura 9, $p < 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney).

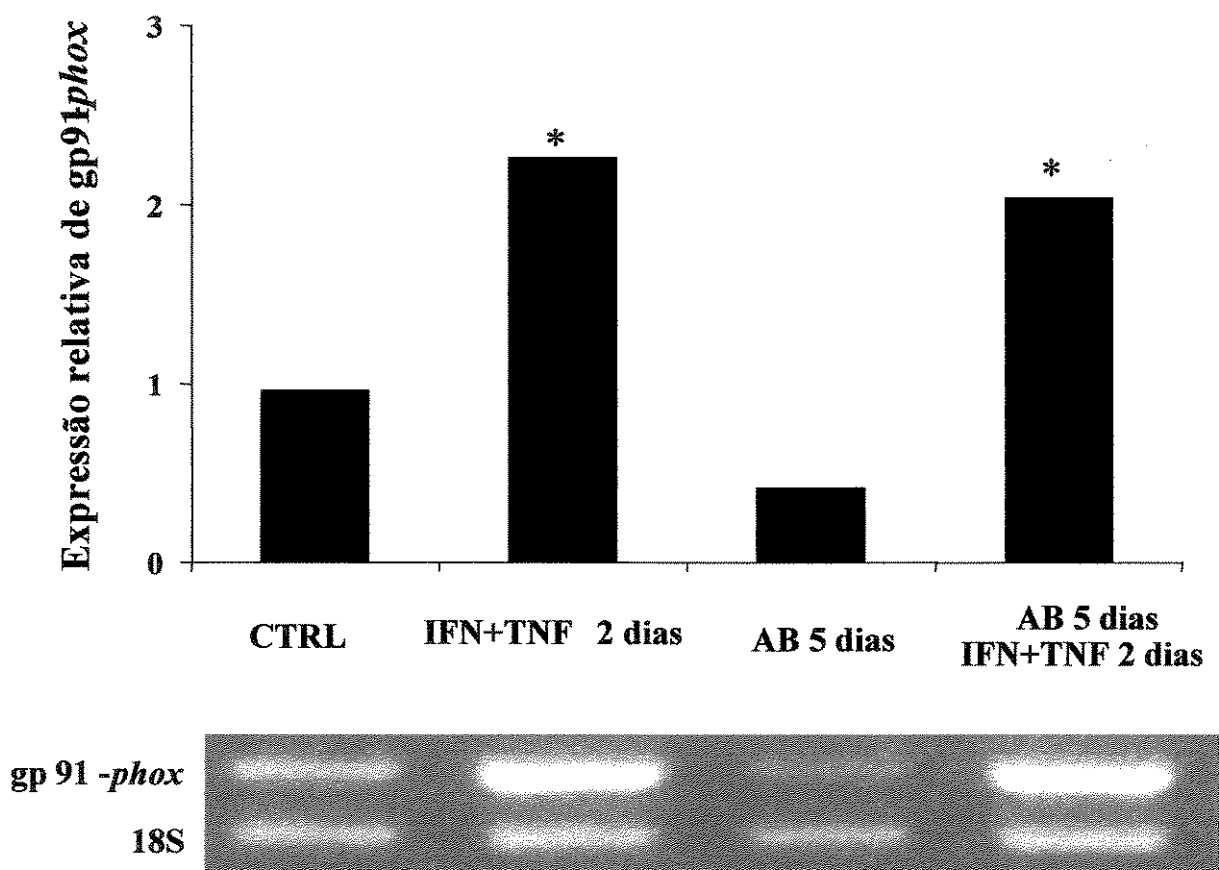


Figura 9 - Efeito do IFN- γ e TNF- α sobre a expressão gênica de gp91-phox.. A cultura das células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 2 dias originou um aumento significativo na expressão gênica relativa de gp91-phox. IFN- γ , TNF- α e AB, também incrementaram esta expressão quando as citocinas foram adicionadas na cultura durante as últimas 48 horas. Os histogramas apresentam a média de 3 experimentos independentes das densitometrias relativas. (* $p < 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney).

4.9 - Expressão do componente p47-phox em células HL-60 clone 15, segundo RT-PCR quantitativa / relativa.

A Figura 10 mostra um gráfico representativo da densitometria relativa dos produtos da reação de RT-PCR, usando oligonucleotídeos específicos para o componente p47-phox do sistema NADPH oxidase (pb = 404) e para o 18S (pb=315). A cultura das células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 2 dias ocasionou um incremento significativo na expressão gênica relativa de p47-phox, em

relação às células em condições basais (Figura 10, $p < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney). Esta diferença não foi significativa quando comparada às células que receberam AB (0,5 mM) por 5 dias mais IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante os dois últimos dias da cultura (Figura 10, $p > 0,05$, $n = 3$, teste de Mann-Whitney). Igualmente, não houve diferença em relação às células que receberam somente AB 0,5 mM por 5 dias. As células que receberam AB (0,5 mM) por 5 dias tiveram expressão gênica relativa de p47-phox similar às células que receberam AB (0,5 mM) por 5 dias mais IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante os dois últimos dias da cultura (Figura 10, $p > 0,05$, $n = 3$, teste de Mann-Whitney).

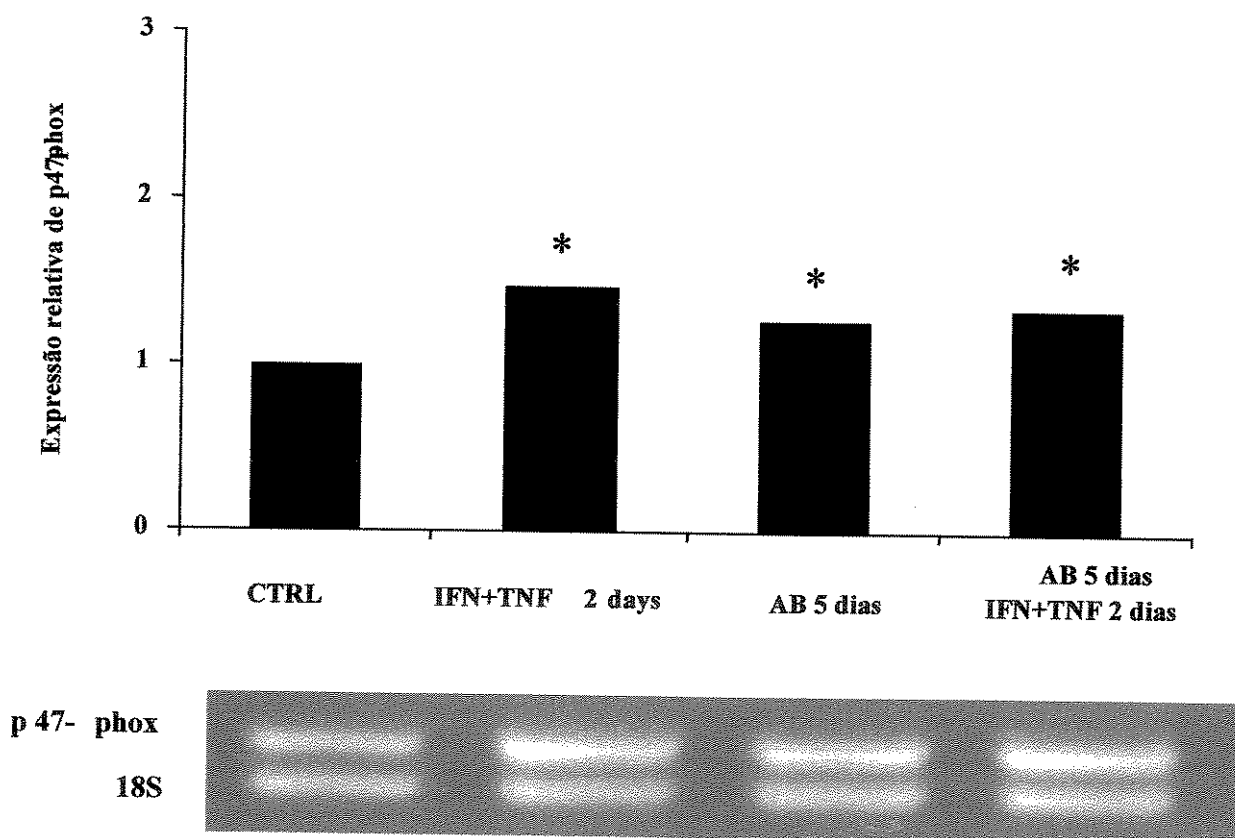


Figura 10 - Efeito do IFN- γ e TNF- α sobre a expressão gênica de p47-phox. A cultura das células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 2 dias originou um aumento significativo na expressão gênica relativa de p47-phox em relação às células em condições basais. Os histogramas apresentam a média de 3 experimentos independentes das densitometrias relativas. (* $p < 0,05$, $n = 4$, teste de Mann-Whitney).

4.10 - Ensaio “Slot Blot”

A Figura 11 mostra os níveis estáveis de RNAm dos genes que codificam a proteína gp91-phox e a proteína p47-phox em células HL-60 clone 15. A diferenciação das células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000u/ml) durante 48 horas, com AB (0,5mM) durante 5 dias e com a adição de IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000u/ml) durante as últimas 48 horas resultou num aumento da expressão do gene gp91-phox quando comparado às células controle (Figura 11 p<0,05 em todas as situações, n=4, teste de Mann-Whitney). Porém, não encontramos diferenças significativas na expressão dos genes quando comparamos os tratamentos entre si (p > 0,05 em todas as situações, n=3, teste de Mann-Whitney).

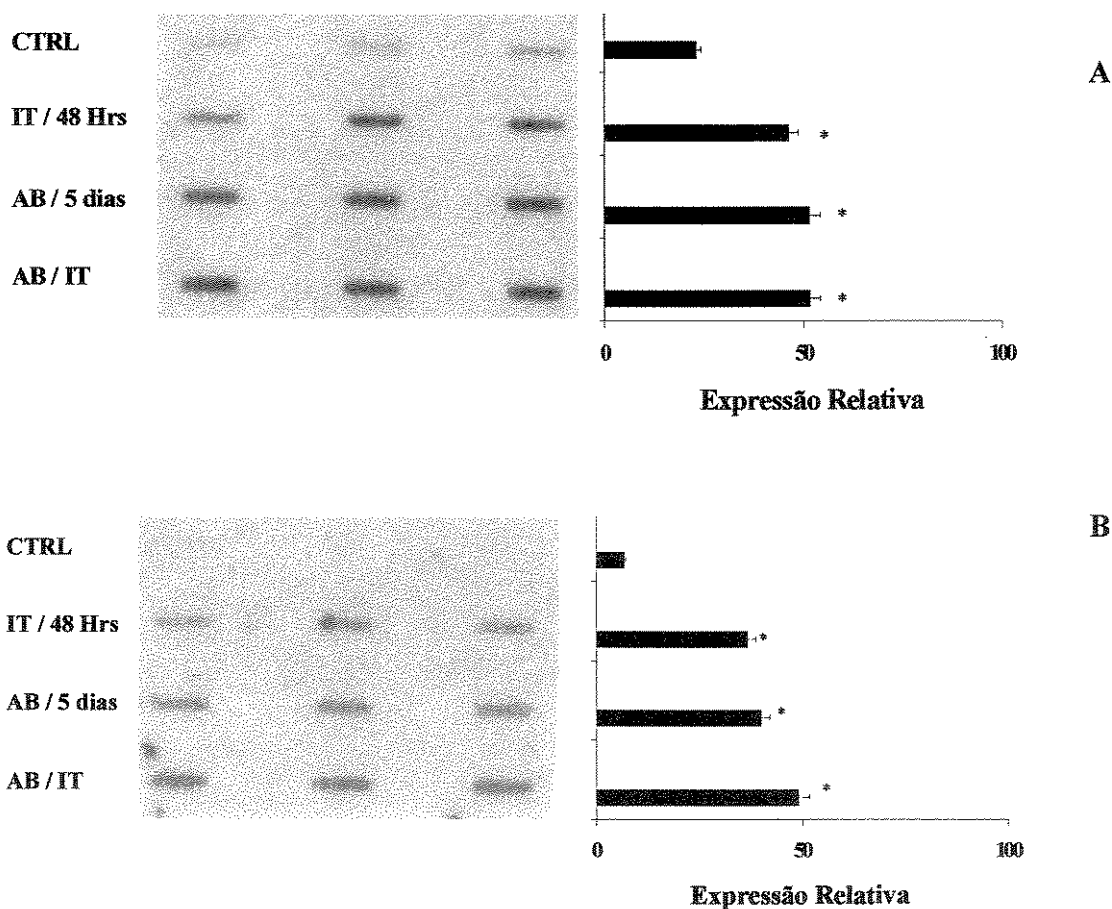


Figura 11 - Ensaio de “Slot blot”. Apresentamos os níveis estáveis do RNAm de (A) gp91-phox e (B) p47 phox em células HL-60 clone 15.

4.11 - Ensaio “Nuclear Run-On”

As células HL-60 clone 15 cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) por 2 dias incrementaram de maneira similar a taxa de transcrição dos genes CYBB e NCF1 que codificam respectivamente gp91-phox e p47-phox, sendo maior neste último, quando comparadas com as células controle (Figura 12, $p < 0,05$, $n = 3$, teste de Mann-Whitney). O AB (0.5 mM) por 5 dias ocasionou um modesto incremento na taxa transcrricional tanto de 91-phox, como de p47 phox. (Figura 12, $p > 0,05$, $n = 3$, teste de Mann-Whitney). A combinação de AB (0.5 mM), IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) por 5 dias produziu um incremento no nível transcrricional de gp91-phox e p47-phox, quando comparada com as células em condições basais (Figura 12, $p < 0,05$, $n = 3$, teste de Mann-Whitney).

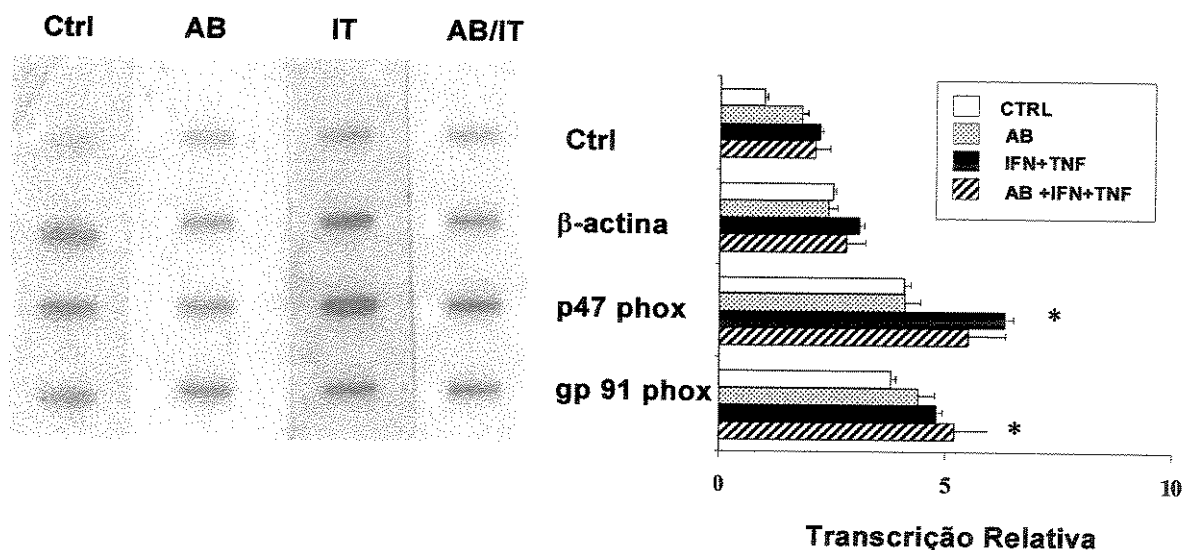


Figura 12 - Ensaio de “nuclear run on” nas células HL-60 clone 15. As células cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) por 2 dias incrementaram a taxa de transcrição dos genes CYBB e NCF1, quando comparadas com as células controle, este aumento foi também observado na combinação de AB, IFN- γ e TNF- α por 5 dias. O AB (0.5 mM) por 5 dias ocasionou um leve aumento na taxa transcrricional tanto de 91-phox, como de p47 phox (* $p < 0,05$, $n = 3$, teste de Mann-Whitney).

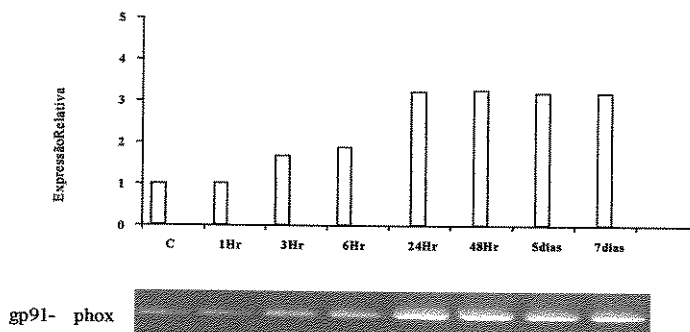
4.12 - Cinética da expressão gênica de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ e TNF- α .

Em experimento prévio encontramos que a expressão gênica de gp91-phox foi mais elevada nas células HL-60 clone 15 que receberam IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante os dois últimos dias da cultura comparada às células controle. Nesta etapa, analisamos em detalhe a expressão do gene *CYBB* ao longo da diferenciação destas células. Portanto, fizemos cinéticas de expressão da gp91-phox, estimulando as células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml), TNF- α (1000 U/ml) ou as duas citocinas juntas durante 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

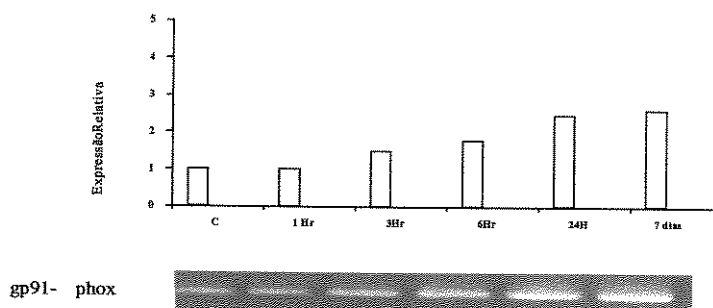
Encontramos que a expressão gênica de gp91-phox nas células HL-60 clone 15 que receberam IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) foi dependente do tempo, no entanto, depois de 48 horas, atinge a estabilidade no nível de expressão, não havendo diferença significativa entre 2 e 7 dias (Figura 13 A). O TNF- α (1000 U/ml), estimulou progressivamente a expressão de gp91-phox até o dia 7 de cultura (Figura 13 B).

A células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) apresentaram um pico máximo de expressão de gp91-phox nas 6 horas de cultura. Após este tempo, o nível de expressão permaneceu constante, ocorrendo um decréscimo no dia 7 (Figura 13 C).

A
Células HL-60 clone 15
estimuladas com
IFN- γ e TNF- α



B
Células HL-60 clone 15
estimuladas com TNF- α .



C
Células HL-60 clone 15
estimuladas com IFN- γ

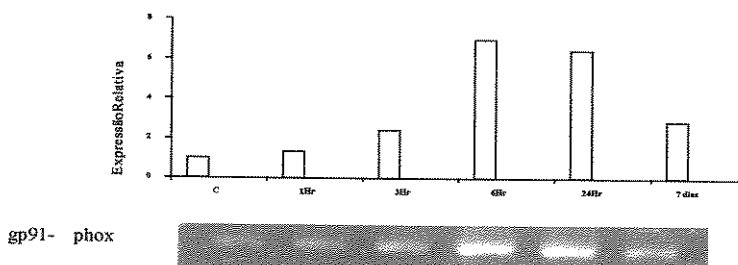


Figura 13 - Cinética da expressão gênica relativa de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ e TNF α . Expressão da gp91-phox, estimulando as células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml), TNF- α (1000 U/ml) ou as duas citocinas juntas durante 1, 3, 6, 24 e 48 horas.

4.13 - Cinética da expressão gênica de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ e TNF- α . Análise por PCR em tempo real.

Fizemos as mesmas cinéticas de expressão para a PCR convencional usando oligonucleotídeos específicos para gp91 phox e estimulando as células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml), TNF- α (1000 U/ml) ou as duas citocinas juntas durante 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. As concentrações dos oligonucleotídeos otimizadas e os tamanhos dos produtos de PCR seguem na Tabela IV. Na Figura 14, apresentamos nossa curva de eficiência para gp91-phox, com um resultado de 100% na amplificação.

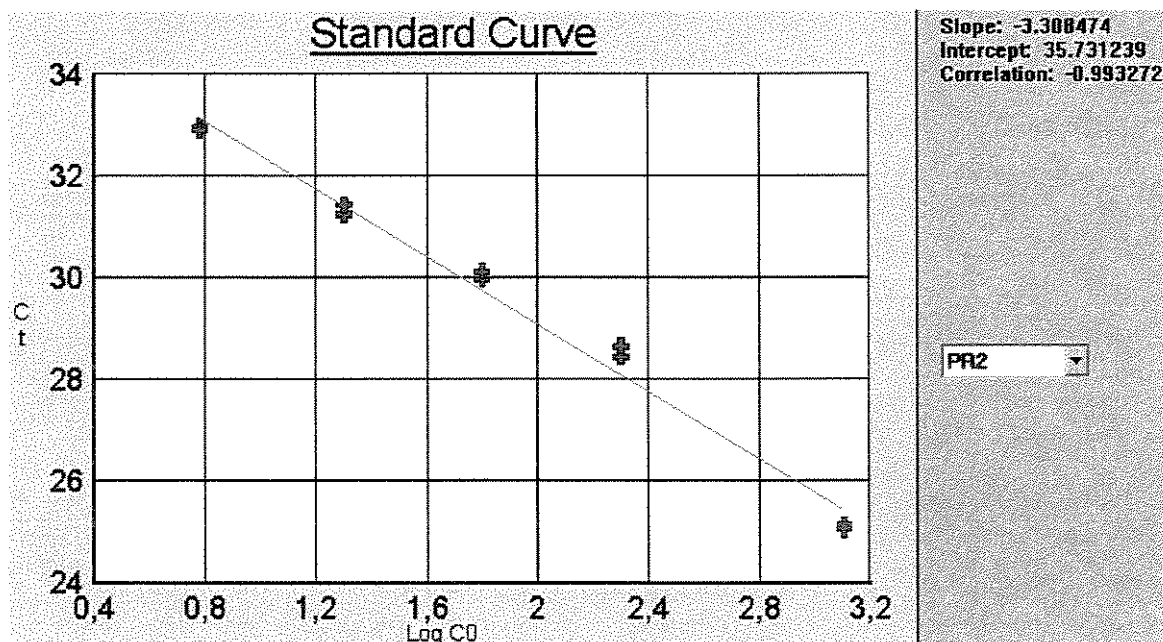


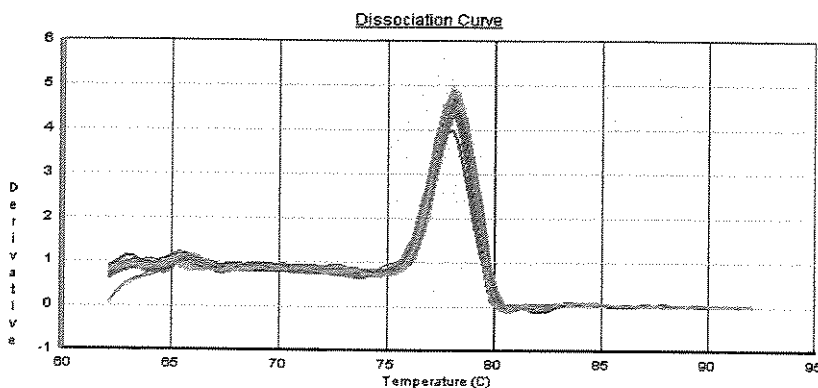
Figura 14 - Curva representativa para gp91-phox com uma eficiência de 100% na amplificação.

Tabela IV - Concentrações de oligonucleotídeos utilizadas na amplificação de genes na técnica de PCR em tempo real. As concentrações foram determinadas pela eficiência de amplificação gerada em condições testadas. Descrevemos também o tamanho do produto de PCR gerado pela reação.

Primer / Gene	Concentração	Produto PCR	Eficiência Amplificação (%)
gp 91-phox	1,2uM	70pb	100%
β -actina	1,2uM	60pb	100%

Para certificar que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por amplificação inespecífica dos oligonucleotídeos, foi feita a análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento. Na Figura 15 apresentamos nossas curvas de dissociação tanto de gp91-phox, como β -actina afastando amplificações inespecíficas. A Figura 16 mostra uma curva de amplificação de PCR em tempo real típica, equivalente à expressão de gp91-phox e β -actina das células HL-60 clone 15 tratadas com IFN- γ e TNF- α e células controle.

Curva de dissociação gp91-phox



Curva de dissociação β - actina

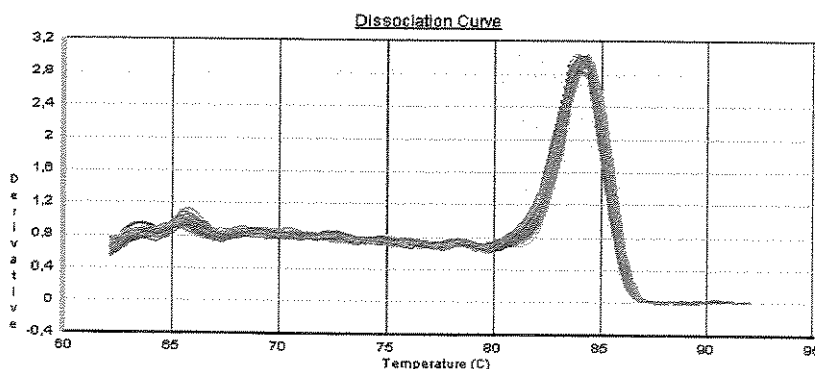


Figura 15 - Curvas de Dissociação. A curva de dissociação foi utilizada para analisar a presença de produtos inespecíficos na reação de PCR. Cada gene analisado tem um produto gerado, e este, uma temperatura de dissociação específica. A dissociação do produto de PCR leva ao desligamento da ligação SYBR Green-DNA, levando à perda de fluorescência que, na figura acima é demonstrada com um pico, o que significa que não temos produtos inespecíficos.

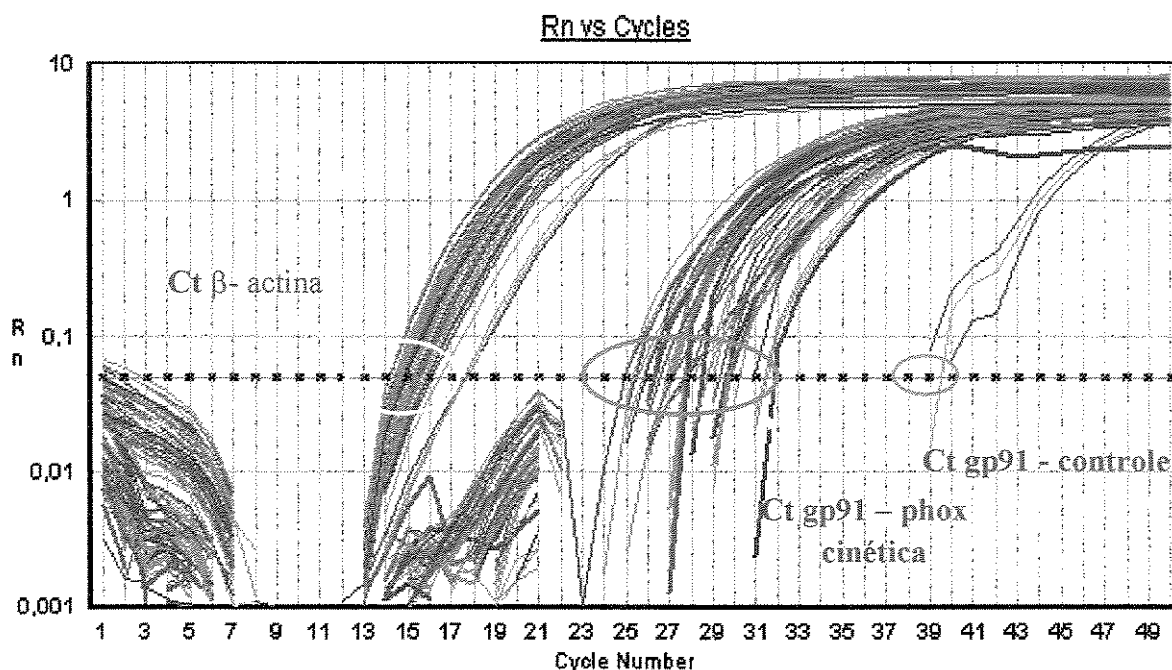


Figura 16 - Curva de amplificação de PCR em tempo real – A análise da morfologia das curvas foi uma forte indicação que a nossa reação ocorreu sem problemas. A curva deve ter uma morfologia sigmóide, mostrando a fase inicial, fase exponencial e fase de platô, onde não ocorrem mais amplificações. Após esta análise é traçado o “*threshold*” e a partir dele coletados os dados em forma de “*Ct*”, ciclos onde a fluorescência “X” na fase exponencial da PCR será convertida em dados de expressão gênica relativa.

Nos experimentos feitos baseados na metodologia do PCR em tempo Real, os resultados são apresentados como o número de vezes em que é expresso o gene comparado com o controle sem tratamento (ou nível de expressão). As células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) apresentaram um pico máximo de expressão de gp91-phox nas 48 horas de cultura (Figura 17A). Igualmente encontramos que o TNF- α (1000 U/ml), estimulou positivamente a expressão de gp91-phox, de tal forma que nas primeiras 24 horas, esta citocina demonstrou um aumento na expressão gênica (Figura 17B) e encontramos que a expressão gênica de gp91-phox nas células HL-60 clone 15 que receberam IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) foi dependente do tempo, sendo que apresenta uma expressão importante nas primeiras 48 horas (Figura 17C).

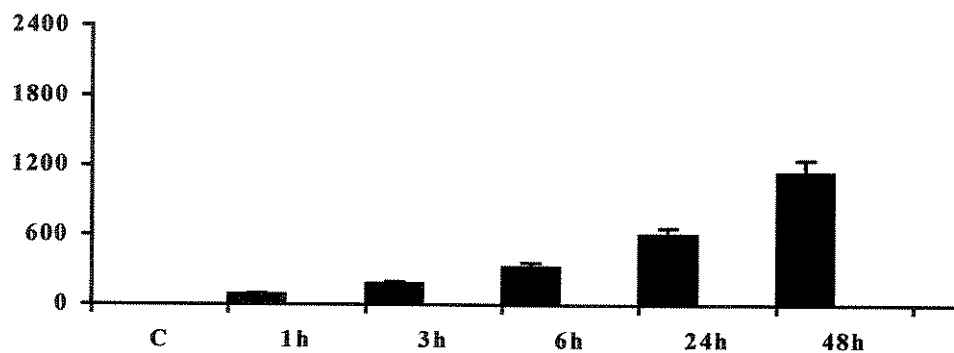


Figura 17 A - Cinética da expressão gênica de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ

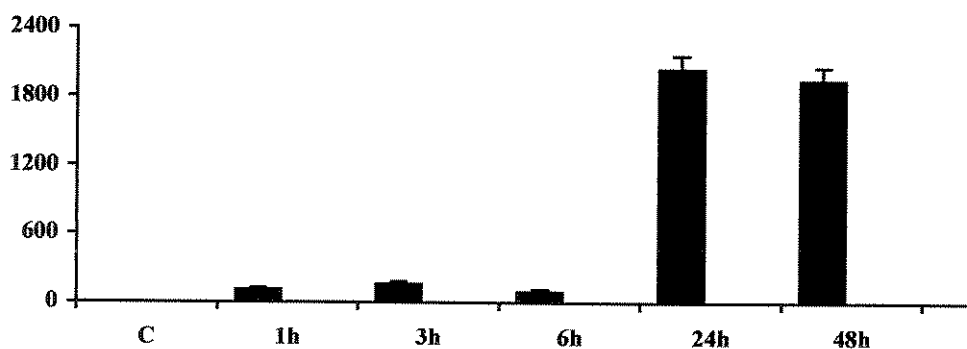


Figura 17 B - Cinética da expressão gênica de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com TNF α

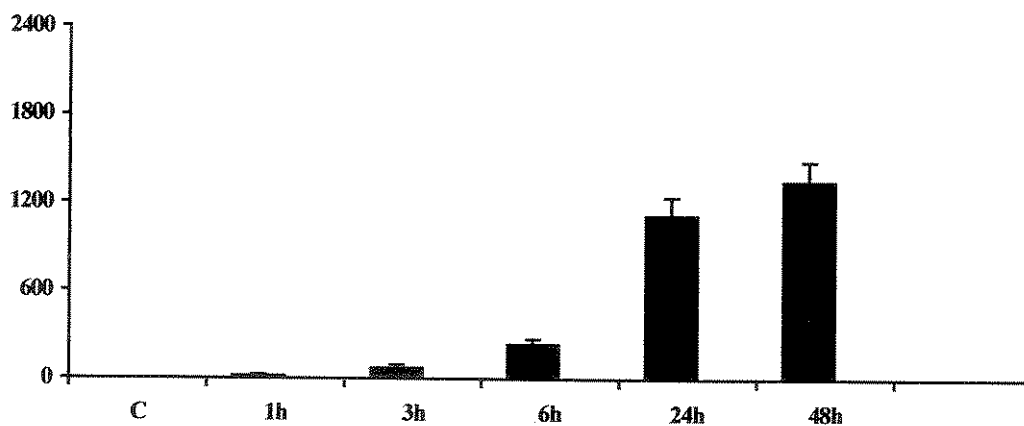


Figura 17C - Cinética da expressão gênica de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ e TNF α .

4.14 - Efeito da dexametasona sobre a atividade NADPH oxidase em células HL-60 clone 15

A Figura 18 mostra que a dexametasona (1 μ M) inibiu significativamente a liberação de superóxido por células HL-60 clone 15, quando adicionada à cultura 24 horas antes das citocinas IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) ($p < 0,05$ Figura 18, $n=4$, teste de Mann-Whitney). As células HL-60 clone 15 cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) apresentaram maior liberação de superóxido estimulada por PMA, quando comparado às células controle, tratadas ou não com dexametasona (1 μ M), (Figura 18, $p < 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney). A dexametasona (1 μ M) não inibiu significativamente a liberação de superóxido por as células HL-60 clone 15 previamente diferenciadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml), (Figura 18, $P < 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney).

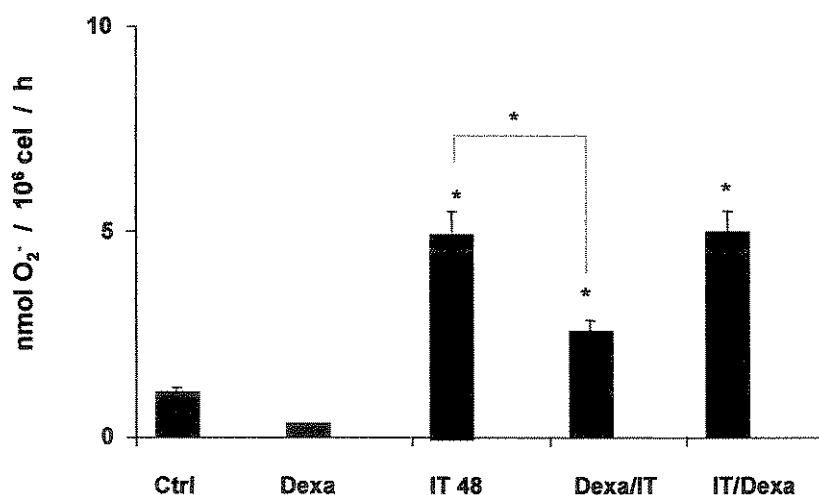


Figura 18 - Efeito da Dexametasona na atividade NADPH oxidase em células HL-60 clone 15. As células HL-60 clone 15 cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) apresentaram maior liberação de superóxido, quando comparado às células controle. A dexametasona (1 μ M) inibiu significativamente a liberação de superóxido por células HL-60 clone 15, quando adicionada à cultura 24 horas antes, mas não após das citocinas (IFN- γ e TNF- α) (* $p < 0,05$, $n=4$, teste de Mann-Whitney)

Passamos a estudar a resposta à dexametasona na circunstância de diferenciação prévia, do ponto de vista molecular, analisando a expressão de gene gp91-phox em células HL-60 diferenciadas com IFN- γ e TNF- α . A Figura 19 mostra que a diferenciação das células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000u/ml) resultou num aumento na expressão do gene gp91-phox quando comparado às células controle (* $p < 0,05$ em todas as situações, $n=3$, teste de Mann-Whitney). A dexametasona (1 μ M) inibiu significativamente a expressão do gene gp91-phox quando adicionada à cultura 24 horas antes das citocinas IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) ($p < 0,05$, Figura 19, $n=4$, teste de Mann-Whitney). Nas células diferenciadas com IFN- γ e TNF- α , a dexametasona (1 μ M) não inibiu a expressão do gene gp91-phox, quando administrada após as citocinas (Figura 19, $p > 0,05$ em todas as situações, $n=3$, teste de Mann-Whitney). O RNA mensageiro que codifica β -actina foi detectado igualmente em todas as amostras analisadas. Nas duas figuras destaca-se a relação que existe entre a expressão molecular e o desenvolvimento funcional das células com iguais tratamentos. Portanto houve um paralelo entre atividade bioquímica e expressão gênica.

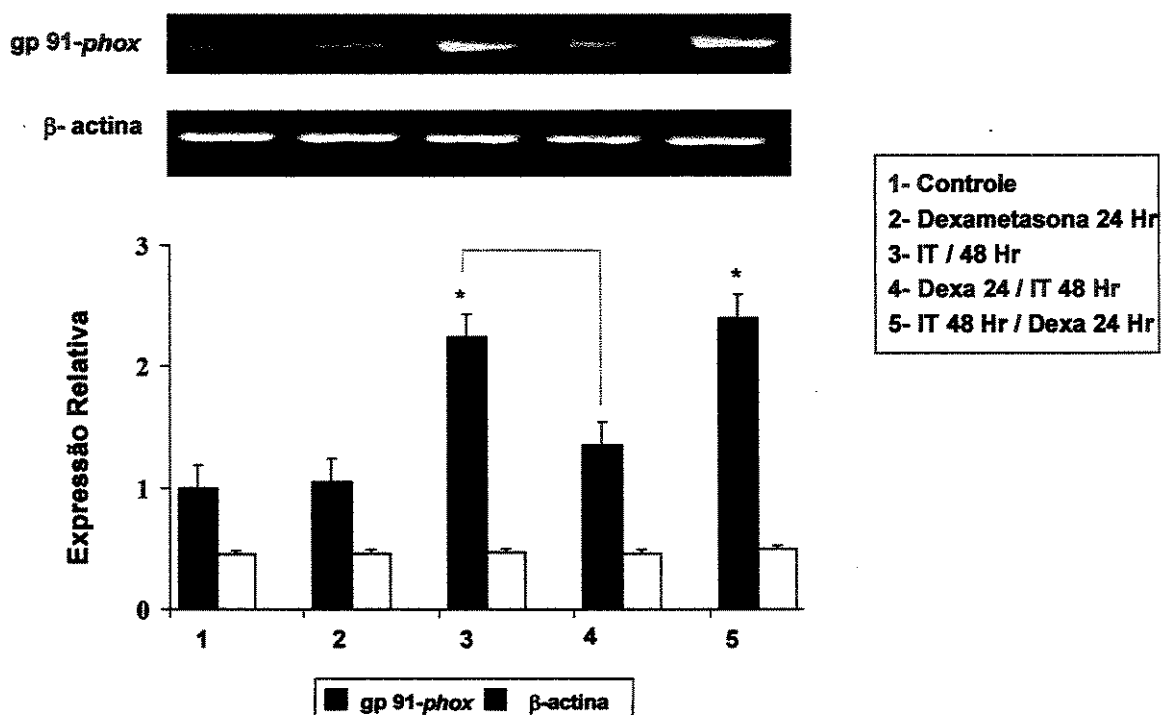


Figura 19 - Efeito da dexametasona na expressão de gp91-phox em células HL-60 clone 15 diferenciadas com IFN- γ e TNF- α . Células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000u/ml) aumentaram a expressão do gene gp91-phox quando comparado às células controle. A dexametasona (1 μ M) inibiu significativamente a expressão do gene gp91-phox quando adicionada à cultura 24 horas antes, mas não após das citocinas IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) (* $p < 0,05$ em todas as situações, $n = 3$, teste de Mann-Whitney).

4.15 - Cultura de leucócitos humanos, provenientes de sangue de cordão umbilical

A viabilidade das células tratadas com IL-3 e IL-5, teve uma leve diminuição durante a primeira semana, seguido por uma recuperação no número, mantendo uma viabilidade superior ao 93%. A viabilidade das células controle que unicamente continham meio, diminuiu drasticamente para menos de 5% após 4 semanas de cultura. (Figura 20), evidenciando a importância das citocinas na promoção do crescimento e diferenciação celular.

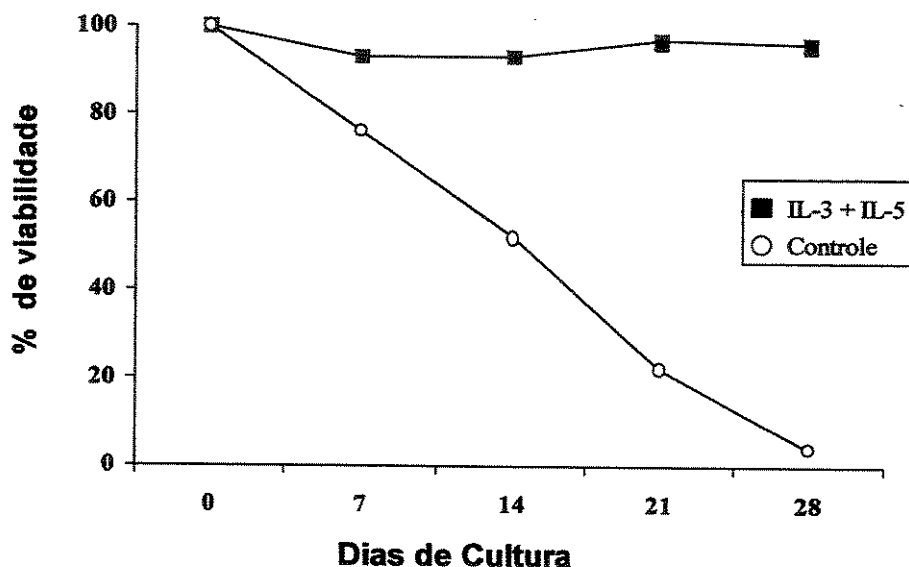


Figura 20 - Viabilidade dos leucócitos do sangue de cordão umbilical. As células cultivadas na presença de Interleucina-5 humana recombinante (rhIL-5, 200 pM) e Interleucina-3 humana recombinante (rhIL-3, 350 pM), mantiveram uma viabilidade superior ao 93% no dia 28 da cultura. Os dados representam a média de três experimentos independentes.

O critério para considerar a diferenciação dos leucócitos provenientes de sangue de cordão para linhagem eosinofílica, foi a detecção dos grânulos eosinofílicos. Quando as células foram cultivadas por uma semana na presença de IL-3 e IL-5, menos de 10% possuíram grânulos eosinofílicos ou basófilos, já no dia 14 foram observados grânulos plasmáticos ($25\% \pm 1,4\%$), alcançando um patamar muito mais elevado nos dias 21 e 28 de cultura nos quais as células desenvolveram grânulos eosinofílicos característicos ($63\% \pm 1,4\%$ e $94,3\% \pm 0,5\%$) respectivamente (Figuras 21 e 22).

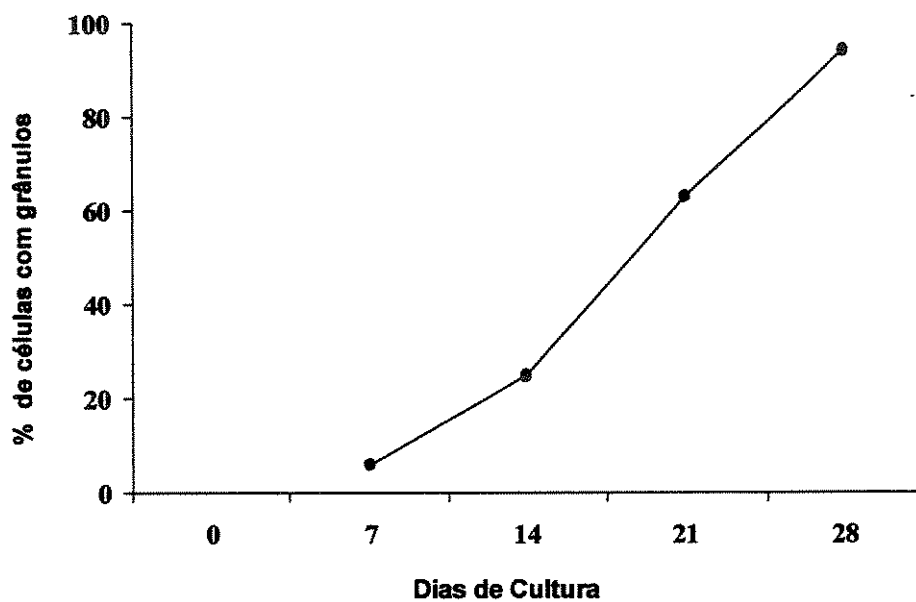


Figura 21 - Indução de diferenciação dos leucócitos provenientes de sangue de cordão umbilical por Interleucina-5 humana recombinante (rhIL-5, 200 pM) e Interleucina-3 humana recombinante (rhIL-3, 350 pM). Para os dias 21 e 28 de cultura as células apresentam maior quantidade de grânulos eosinofílicos característicos. Os dados representam a média de três experimentos independentes.

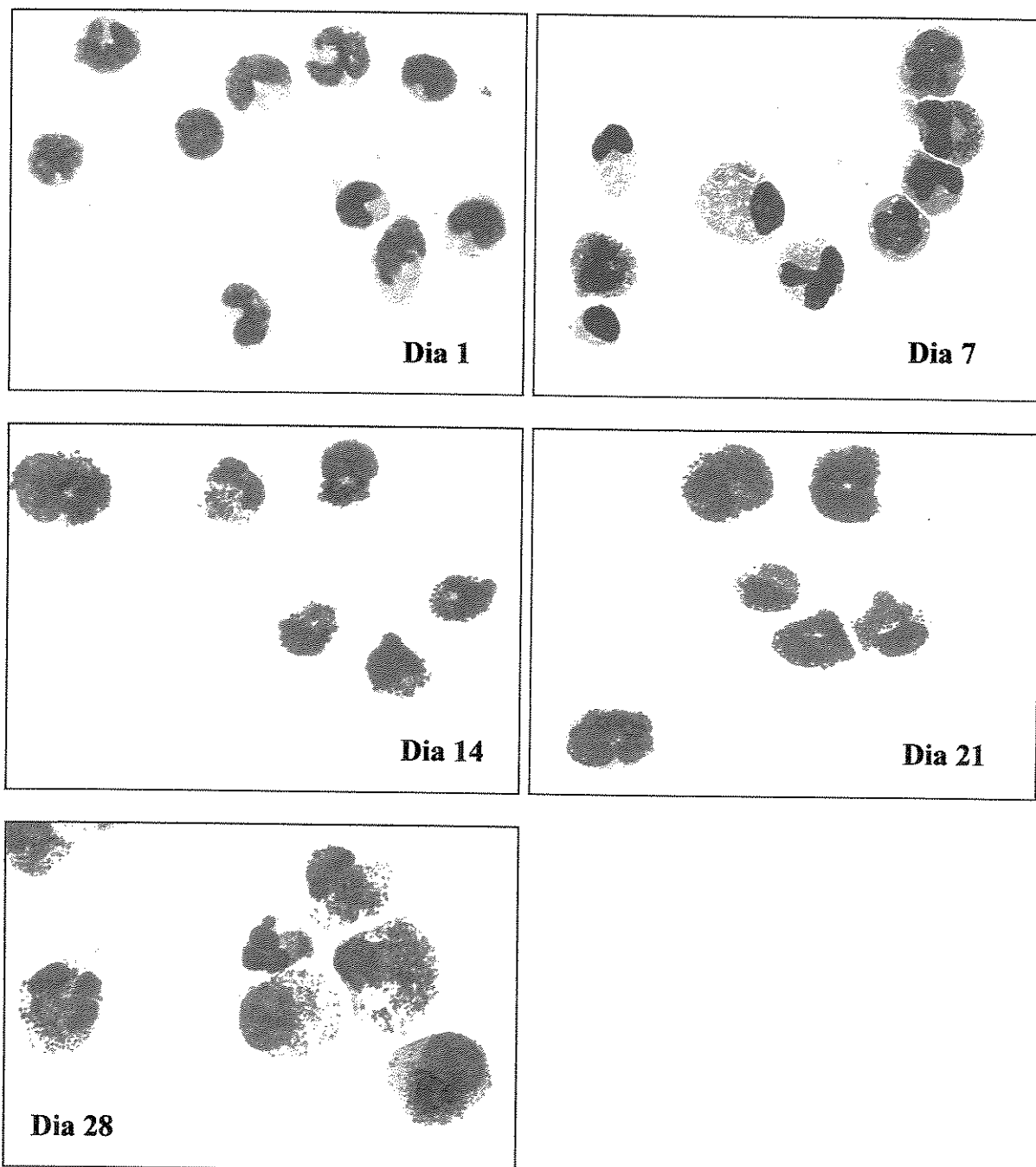


Figura 22 - Características morfológicas dos grânulos eosinofílicos Leucócitos derivados de sangue de cordão umbilical cultivados com interleucina-5 (IL-5, 200 pM) e interleucina-3 (IL-3, 350 pM). As fotos apresentam as características morfológicas dos grânulos eosinofílicos, após “cytospin” e coloração com May-Grunwald nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 da cultura.

4.16 - Caracterização molecular da diferenciação eosinofílica das células provenientes de sangue de cordão umbilical

Para demonstrar que existiu uma verdadeira diferenciação eosinofílica, identificamos a expressão de uma proteína específica de eosinófilos (MBP), por meio de RT-PCR. A Figura 23 evidencia uma forte expressão de MBP no dia 28 de cultura dos leucócitos provenientes de sangue de cordão e estimuladas com IL-5 e IL-3, quando comparadas ao dia primeiro da cultura. A expressão gênica de β -actina foi detectada em todas as amostras analisadas.

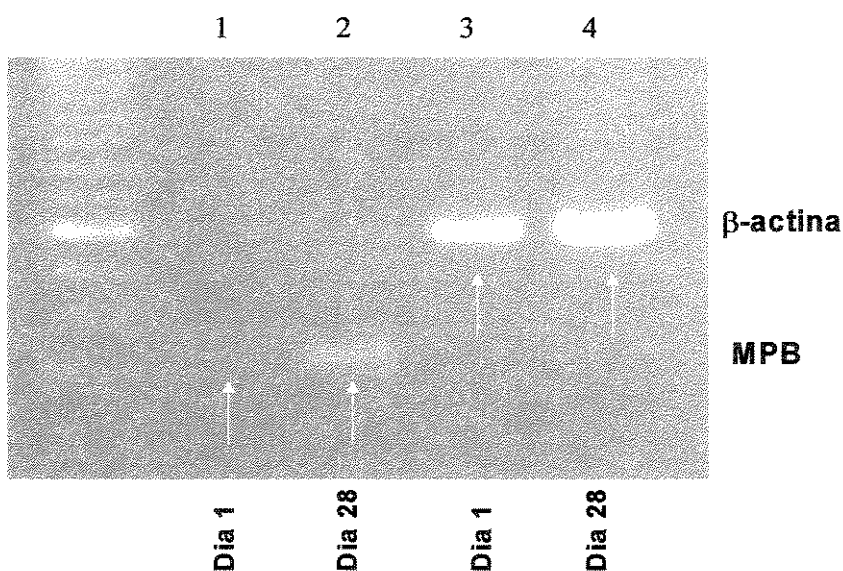


Figura 23 - Expressão de MBP em células provenientes de sangue de cordão umbilical. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR realizada com oligonucleotídeos para a proteína MBP dos eosinófilos. Os leucócitos provenientes de sangue de cordão umbilical foram diferenciados com IL-5 (200 pM) e IL-3 (350 pM) durante 28 dias (pista 2 e 4). Células não diferenciadas (pista 1 e 3).

4.17 - Atividade NADPH oxidase das células provenientes de sangue de cordão umbilical

Evidenciamos um incremento significativo na liberação de superóxido no dia 28 de cultura das células provenientes de sangue de cordão cultivadas com IL-5 (200 pM) e IL-3 (350 pM), quando comparada ao dia 1 (Figura 24).

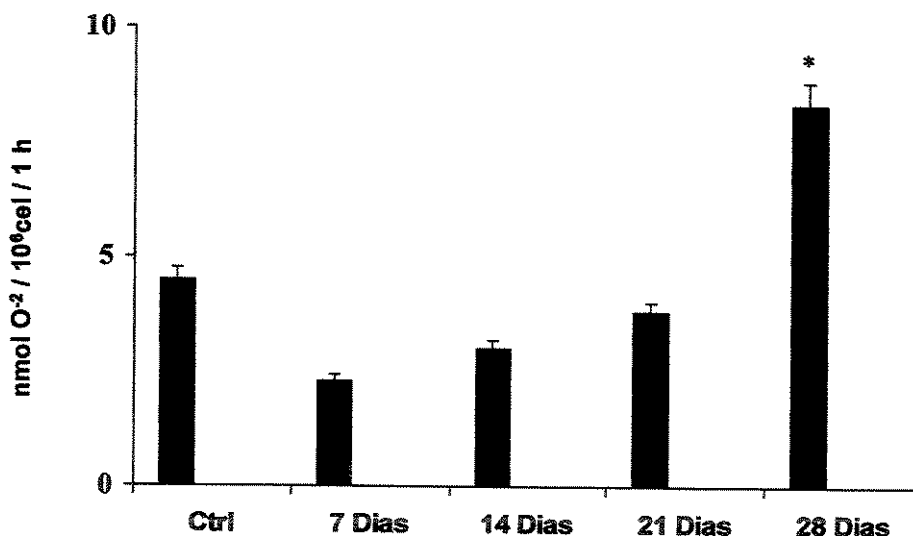


Figura 24 - Atividade NADPH oxidase dos leucócitos provenientes de sangue de cordão umbilical. Foi quantificada a liberação de superóxido utilizando-se o ensaio da redução do citocromo C. Os leucócitos provenientes de sangue de cordão umbilical, diferenciados com IL-5 (200 pM) e IL-3 (350 pM) apresentaram um aumento significativo na liberação de superóxido no dia 28 de cultura. Os histogramas representam a média de 4 experimentos independentes (*p<0,005).

4.18 - Expressão de gp91-phox em leucócitos de cordão umbilical diferenciadas com IL-5 (200 pM) e IL-3 (350 pM) segundo RT-PCR convencional

Os leucócitos de cordão diferenciados com IL-5 (200 pM) e IL-3 (350 pM), apresentaram um incremento significativo na expressão gênica de gp91-phox nos dias 21 e 28 de cultura quando comparada às células do dia 1 (Figura 25, p<0,05 em ambas as situações, n= 4, teste de Mann-Whitney). A expressão gênica de β -actina foi detectada em todas as amostras.

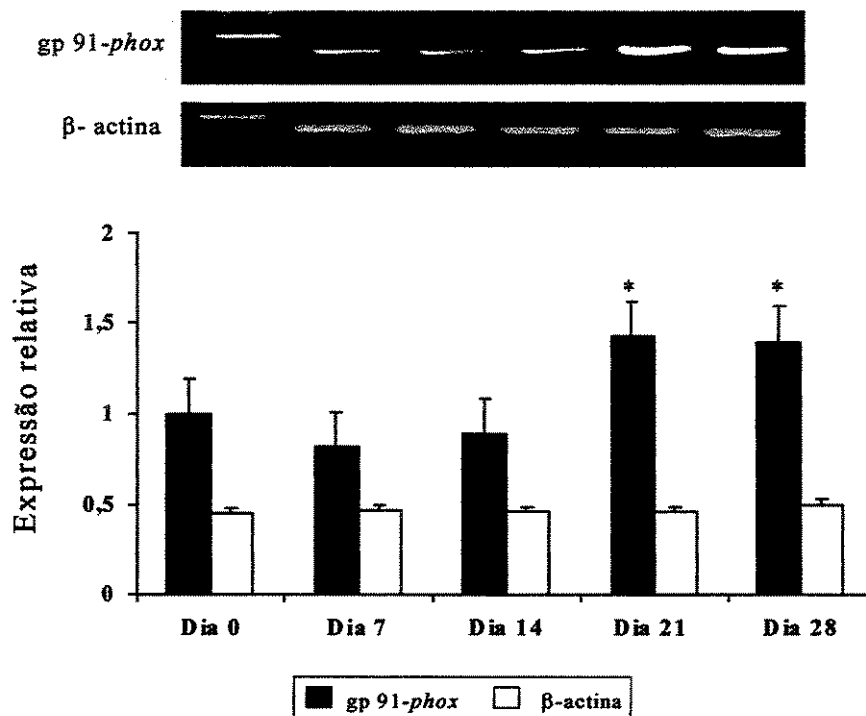


Figura 25 - Expressão de gp91-phox em leucócitos de cordão umbilical diferenciados com IL-5 (200 pM) e IL-3 (350 pM). Painel superior; produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos para gp91-phox e β -actina. O painel inferior representa a expressão relativa. Observamos um incremento significativo na expressão gênica de gp91-phox nos dias 21 e 28 de cultura (* $p < 0,05$ $n = 4$, teste de Mann-Whitney).



5 - DISCUSSÃO

As células fagocíticas do sangue, tais como, neutrófilos ou eosinófilos são chaves efetoras do sistema imune inato, e são a primeira linha de defesa contra as infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias. A principal ferramenta destas células é o sistema NADPH oxidase. Este multicomponente enzimático, é um complexo que transporta elétrons desde o NADPH citoplasmático até o oxigênio molecular, gerando desse modo quantidades elevadas de radicais livres do oxigênio, tais como o ânion superóxido (O_2^-), o qual subsequenteiramente dismuta a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultando na formação de outras espécies mais reativas que podem destruir os patógenos invasores. No entanto, uma ação inapropriada ou uso excessivo deste sistema, resulta numa alteração inflamatória. Portanto, a ativação e a inativação da oxidase deve ser um processo finamente regulado, de tal modo, que a análise dos mecanismos moleculares que regulam a expressão e função deste sistema é de grande importância para a compreensão da fisiologia das células fagocíticas e de sua atividade microbicida. A ativação do sistema NADPH oxidase de eosinófilos e a conseqüente liberação de superóxido é tida como parte integrante dos mecanismos de defesa contra parasitas e helmintos. Entretanto, pouco se sabe sobre o controle transcricional e a regulação da expressão dos genes que codificam os diversos componentes do sistema NADPH oxidase de eosinófilos humanos.

Os eosinófilos têm sido envolvidos na patogênese de doenças não parasitárias, contribuindo potencialmente para o dano tecidual durante os processos inflamatórios alérgicos crônicos, estes incluem, a dermatite atópica e asma (WELLER, 1994). Uma vez presentes nos tecidos inflamados, os eosinófilos ativados geram e liberam espécies citotóxicas implicadas na infamação, que incluem mediadores lipídicos, proteínas inflamatórias, além dos reativos intermediários do oxigênio. Igualmente, expressam na membrana seu marcador de ativação CD69, e aumentam sua sobrevivência, fenômeno atribuído à inibição de sua apoptose por citocinas hematopoéticas (SUR et al., 1993). Citocinas como o fator estimulador de colônias granulócito macrófago (GM-CSF), interleucina 3 (IL-3) e interleucina 5 (IL-5), promovem a eosinofilopoese *in vivo*, regulam positivamente algumas funções dos eosinófilos e incrementam a sobrevivência de células maduras (OCHIAI, 1999). Sua ausência tem sido demonstrada a causa de morte e apoptose destas células (DOMAE et al., 2003). A IL-3, além de ativar os eosinófilos, permite que eles apresentem super antígenos e peptídeos às células T (CELESTIN et al., 2001). Por outro lado, citocinas

proinflamatórias, como Interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), suportam a sobrevivência dos eosinófilos *in vitro* e incrementam certas funções dos mesmos, como por exemplo, a expressão do receptor Fc e moléculas de adesão.

O desenvolvimento e diferenciação dos eosinófilos têm sido estudados a partir de vários modelos, entre eles está, a linhagem celular HL-60 "clone 15" (FISCHKOFF, 1988). Quando o clone 15 de HL-60 é estimulado com ácido butírico, pode-se induzir sua diferenciação *in vitro* para células com características similares a eosinófilos maduros (PLAETINCK, 1990). Outro modelo bem caracterizado é obter leucócitos humanos derivados de sangue de cordão umbilical e cultivá-los na presença de IL-3 e IL-5 (ZARDINI, 1997), deste modo, certas características do desenvolvimento normal dos eosinófilos também são totalmente reproduzidas. No entanto, é conhecido que eosinófilos maduros normais isolados de sangue periférico, não sobrevivem mais do que quatro dias *in vitro* sem adição de citocinas (YAMAGUCHI, 1991). IL-3, IL-5, podem regular o crescimento, diferenciação e sobrevivência dos eosinófilos e sua ausência, pelo contrario é a causa de morte e apoptose, não excedendo às 48 horas de vida. (KANKAANRANTA, 2000).

Este trabalho confirma o achado de FISCHKOFF et al.(1988) que o AB 0,5 mM induz a diferenciação das células HL-60 clone 15. No entanto, frente a incubações prolongadas, ocorre diminuição de sua capacidade proliferativa e viabilidade celular (Tabela III), de maneira que 7 dias foi o tempo ideal de cultura. As células apresentaram certas características de eosinófilos maduros, evento que foi evidenciado por análise de RT-PCR, ao serem capazes de expressar proteínas constitutivas dos eosinófilos, como (EPO) e (MBP), quanto aos leucócitos derivados de sangue cordão umbilical cultivados com IL-3 e IL-5, observamos uma seletiva proliferação e diferenciação na cultura, tendo uma viabilidade superior ao 93% depois da segunda semana de cultivo, sendo que mais de 90% das células se diferenciaram em eosinófilos maduros, ricos em grânulos. Na quarta semana, apresentam uma morfologia eosinofílica típica quando foram coradas com May-Grunwald. Os resultados obtidos sugerem que a combinação de IL-3 e IL-5 age de forma concomitante para estimular a proliferação e sobrevivência das células precursoras, fato que foi evidenciado quando as células estiveram em meio sem citocinas, o que

ocasionou uma dramática diminuição na viabilidade celular, A diferenciação eosinofílica também foi confirmada por análise de RT-PCR, evidenciando a expressão MBP.

Nas células HL-60 clone 15 cultivadas com AB, observamos uma leve aparição da expressão de MBP no primeiro dia. Este achado poderia dever-se ao fato que células eosinofílicas imaturas podem armazenar uma pró-forma de MBP (pró MBP) na periferia dos seus grânulos imaturos (ROSENBERG, 1996). Além disso, em crescimento ativo, as células HL-60 expressam MBP, como marcador de linhagem de eosinófilos, com uma expressão pré-programada, o que levaria a uma diferenciação eosinofílica em condições favoráveis de cultura (STEVEN, 1984). Portanto, a MBP é usada como um marcador de maturação da linhagem eosinofílica, uma vez que sua expressão aumenta durante a diferenciação dos eosinófilos (FISCHKOFF, 1984). O nível de expressão de MBP, também pode variar dependendo do compartimento estudado, por exemplo, Hashida et al, (2001), observaram um nível de expressão de MBP significativamente diferente quando compararam eosinófilos de sangue periférico de doadores saudáveis com células CD34+ de sangue de cordão umbilical, que tinham sido estimulados a diferenciar-se em eosinófilos. GRUART et al. (1992), encontraram uma diminuição nos níveis de transcrito de MBP durante cultura prolongada de células do cordão e sua ausência em eosinófilos maduros periféricos. Em contraste, neste trabalho evidencia que mesmo na quarta semana de cultura, as células derivadas de cordão expressam MBP. Hashida et al. (2001) do mesmo modo, demonstram a presença de MBP como marcador diagnóstico, revelando que a expressão do transcrito em células tratadas com IL-5 e IL-3 incrementa até duas semanas, seguida por uma diminuição já na terceira semana. De forma semelhante, em nosso estudo a IL-5 (200 pM) também estimulou a expressão gênica de EPO e MBP nas células HL-60 clone 15 depois de 7 dias de cultura, junto com a diferenciação de células com características de eosinófilos, confirmando a capacidade desta citocina em induzir a diferenciação eosinofílica e de ser um fator eosinofilo-poético *in vivo*, como previamente reportado por outros investigadores (SHALIT et al., 1995; TAKAMOTO e SUGANE, 1995; ISHIZUKA et al., 1996). A expressão gênica da IL-5 pode ser estimulada pelo IFN- γ em linhagens celulares eosinofílicas (ISHIZUKA et al., 1996) e junto com o TNF- α podem atuar sinergicamente para induzir a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM 1) e o HLA-DR nos eosinófilos. O RNA mensageiro de IL-5 já foi encontrado em células EoL-1

cultivadas com IFN- γ (1000 U/ml) por 72 horas (ISHIZUKA et al., 1996), sugerindo que o IFN- γ estimula a transcrição da IL-5.

Queremos destacar o incremento na expressão gênica de EPO e MBP quando as células HL-60 foram cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) durante 48 horas. Este foi o primeiro indício que estas citocinas induzem as células HL-60 clone 15 a diferenciar-se em células eosinofílicas. Resultado semelhante foi encontrado ao realizar uma cinética de expressão usando oligonucleotídeos específicos para EPO, estimulando as células HL-60 clone 15 com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml), observando que as células foram progressivamente diferenciadas. Por outro lado, demonstrou-se que o TNF- α pode induzir a liberação de EPO a partir dos eosinófilos, o que evidencia que as células estão ativamente em processo de diferenciação. Além disto, o TNF- α pode ativar a expressão da eotaxina e portanto, contribuir para a quimiotaxia dos eosinófilos e provavelmente para a ativação de NF- κ B e MAP quinases (SHAKOORY et al., 2004) nos primeiros estágios de diferenciação.

Uma vez demonstrada a diferenciação eosinofílica, passou-se a estudar a liberação de superóxido e a expressão de gp91-phox. Estudos sobre a ativação NADPH oxidase dos eosinófilos mostraram uma forte semelhança entre eosinófilos e neutrófilos na montagem e ativação deste complexo. No entanto, os eosinófilos geram 10 vezes mais O_2^- extracelular do que os neutrófilos, o qual pode ter origem na elevada expressão do sistema NADPH oxidase nos eosinófilos (YAGISAWA, 1996). Possivelmente, os reativos intermediários do oxigênio poderiam interagir com o conteúdo dos grânulos protéicos, por exemplo, EPO ou MBP, gerando agentes tóxicos oxidantes. Também é conhecido que a atividade NADPH oxidase pode ser modulada por agentes anti-inflamatórios e citocinas que incrementam IFN- γ (NEWBURGER et al., 1988), TNF- α (CONDINO-NETO et al., 1998), IL-5 (HORIE, 1996) ou diminuem (IL-4, IL-10, IL-13) a produção de reativos intermediários do oxigênio em resposta a vários agonistas e em diferentes linhagens celulares (ROSENBERG, 1996). Por exemplo, IFN- γ e TNF- α incrementam a quimioluminescência dependente de luminol e a liberação de peróxido de hidrogênio pelas células EoL-1 (YOSHIE et al., 1989; OHTSU et al., 1993). Porém a base molecular desta regulação não foi totalmente elucidada até o momento.

No estado indiferenciado, tanto os leucócitos provenientes de sangue de cordão como as células HL-60 clone 15, apresentaram uma baixa atividade NADPH oxidase. Entretanto, após a adição de AB (0,5 mM) no caso das células HL-60 clones 15 ou IL-3 e IL-5, no caso dos leucócitos provenientes de sangue de cordão, apresentaram maior liberação de superóxido, indicando que o sistema NADPH oxidase encontra-se ativo. Este padrão é semelhante ao modelo de células THP-1 diferenciadas com IFN- γ e TNF- α (CONDINO-NETO et al., 1998). Especificamente, nos leucócitos provenientes de sangue de cordão, a liberação máxima de superóxido foi no dia 28 de cultura. Nas células HL-60 clone 15 cultivadas com AB, determinamos a atividade NADPH oxidase e comparamos esta atividade com células cultivadas em condições basais e na presença ou ausência de IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) (IT) durante 5 e 7 dias. Verificou-se que o AB induz um incremento significativo na atividade NADPH oxidase das células HL60 clone 15. Depois de 2 dias de cultura, IFN- γ e TNF- α também ocasionaram um incremento significativo na liberação de superóxido, mostrando que IFN- γ e TNF- α são suficientes para induzir atividade NADPH oxidase na linhagem eosinofílica como foi apresentado anteriormente em outras linhas celulares mielóides (CONDINO-NETO, 1998), (NEWBURGER, 1988). IFN- γ , TNF- α e AB associado também demonstraram um aumento significativo na ativação do sistema NADPH oxidase nas células HL-60 clone 15 cultivadas durante 5 dias, mas não por 7 dias. A demonstração que as citocinas IFN- γ e TNF- α induzem uma expressão significativa da atividade NADPH oxidase, confirmaram os resultados por nós observados em células THP-1, U-937 e HL-60 clone 15 (CONDINO, 1998 ; LÓPEZ et al., 2003). Também, Cassatella et al. (1989) em monócitos humanos, demonstraram que o TNF- α incrementa a expressão de p47-phox e o IFN- γ a de gp91-phox, p47-phox e p22-phox. Porém o mecanismo molecular para a atuação destas citocinas no sistema NADPH oxidase não foi totalmente elucidado.

Observou-se também uma associação entre liberação de superóxido e a indução da expressão de gp91-phox nos dois modelos. Assume-se que a produção de superóxido pelos neutrófilos e macrófagos é uma consequência direta da ativação do sistema NADPH oxidase, entretanto, a relação funcional entre produção de superóxido e regulação da expressão de gp91-phox em eosinófilos não foi estudada detalhadamente. Outros estudos

evidenciam que a vida média dos transcritos de gp91-phox não é afetada por indutores de diferenciação como o IFN- γ e TNF- α , sugerindo uma regulação pós-transcricional (CASSATELLA, 1989). Nossos resultados mostram que o AB induz um aumento na expressão gênica de gp91-phox depois de 3 ou 7 dias de cultura. Neste caso, uma significativa liberação de superóxido foi observada a partir do terceiro dia da cultura com AB, mostrando que a atividade NADPH oxidase em nosso modelo, pode ser dependente de outros fenômenos além da expressão gênica, mas também indicando que a expressão de gp91-phox pode acontecer mais cedo no programa de diferenciação eosinofílica do que a expressão de EPO e MBP fato demonstrado pela expressão de gp91-phox nas células controle. Nos leucócitos derivados de sangue de cordão, a expressão do componente gp91-phox foi compatível com o resultado em atividade NADPH oxidase, onde encontramos um incremento significativo na expressão gênica de gp91-phox a partir da terceira semana de cultura, quando comparado às células controle. Assim, IL-3 e IL-5 são suficientes para induzir a diferenciação eosinofílica. Nossos resultados são consistentes com diversos estudos em que a IL-5 e a IL-3 induzem um crescimento substancial dos eosinófilos provenientes de sangue periférico e de progenitores de medula óssea (TAKAMOTO e SUGANE, 1995; OCHIAI et al., 1999; HASHIDA et al., 2001).

Queremos ressaltar então, que as respostas encontradas em relação à diferenciação celular, produção de superóxido e regulação da expressão de gp91-phox foram similares nos dois modelos propostos, sendo que o processo de diferenciação eosinofílica nos leucócitos derivados de sangue de cordão é mais pausado em relação às células HL-60 clone 15.

O RT-PCR convencional é uma técnica utilizada para verificar expressão gênica, tendo grande sensibilidade e potência. Porém, em nosso caso, notamos uma grande variabilidade nos resultados iniciais. Por esta razão, optamos por utilizar o RT-PCR quantitativo-relativo, uma técnica mais apurada para a avaliação da expressão gênica dos genes CYBB e NCF1. A vantagem desta metodologia é o uso de um controle interno (RNAr 18S), utilizado para normalizar os produtos, compensando as possíveis variações dos erros de pipetagem, da qualidade do RNA e das reações entre os diversos tubos e determinar os níveis relativos da expressão do gene de interesse

Na análise por meio do RT-PCR quantitativo-relativo, encontramos incremento significativo na expressão gênica de gp91-phox e p47 phox nas células HL-60 clone 15 cultivadas durante 48 horas com IFN- γ e TNF- α , quando comparado às células controle. Este resultado foi compatível com o ensaio de liberação de superóxido. Assim, estas citocinas são suficientes para induzir a diferenciação eosinofílica como foi anteriormente descrito para o AB (FISCHKOFF, 1988) e induzir a expressão gênica dos componentes da NADPH oxidase (LÓPEZ et al., 2003). Estes resultados sugerem que a atividade NADPH oxidase pode estar regulada pelo menos em parte, ao nível da expressão gênica, resultado consistente com o observado em neutrófilos (HUA et al., 2000) e monócitos (CONDINO et al., 1998). De forma similar, HUA et al. (2001) encontraram que todos os componentes do sistema NADPH oxidase estão expressos após os estágios mielóides durante a maturação eosinofílica. Desta forma, as células HL-60 clone 15 se constituem numa ferramenta útil para estudar aspectos do sistema NADPH oxidase em eosinófilos humanos, assim como sua participação em diversas patologias humanas, como asma, rinite, dermatites e doenças parasitárias.

Na transcrição gênica está envolvida uma intrincada relação da maquinaria de regulação, esta inclui, a regulação transcricional e pós-transcricional de múltiplos ativadores e repressores. No entanto, há pouca informação sobre os fatores de transcrição para os componentes da NADPH oxidase em eosinófilos. Supondo que a expressão dos componentes do sistema oxidase em eosinófilos e neutrófilos seguem um padrão similar, espera-se que fatores de transcrição comuns estejam envolvidos nesta expressão (HUA et al., 2001). A expressão dos genes que codificam gp91-phox e p47phox, é induzida coordenadamente segundo o estado de diferenciação celular e a expressão destes genes segue até a morte celular (SKALNIK, 1991), deste modo, diferentes cascatas de fosforilação durante a diferenciação da linhagem mielóide são requeridas para inibir ou induzir repressores ou ativadores transcricionais.

Por outro lado, apesar de um amplo número de genes que codificam as proteínas específicas dos eosinófilos terem sido clonados e seus promotores analisados, a regulação molecular de sua expressão está menos estudada que em outras células mielóides. Os eosinófilos expressam um único padrão de genes, portanto deveriam ter mecanismos

regulatórios específicos. No entanto, alguns genes amplamente expressos em células mielóides exibem uma regulação única dentro dos eosinófilos, por exemplo, a regulação da expressão de gp91-phox específica dos eosinófilos foi descoberta num paciente com doença granulomatosa crônica, que tinha perdido a expressão de gp91-phox na maioria das células mielóides, porém, nos eosinófilos esta expressão era especificamente mantida (KURIBAYASHI et al., 1995). GATA-1 e GATA-2 estão presentes em eosinófilos, mas não em neutrófilos ou monócitos/macrófagos, e induz a expressão de gp91-phox (YANG et al., 2000a). Este resultado ilustra como diferentes linhagens celulares dentro do compartimento mielóide utilizam um único mecanismo regulatório para dirigir a expressão de um gene.

Recentemente demonstrou-se num paciente, uma mutação pontual no motivo PU.1, ocasionando uma débil união ao promotor de gp91-phox, o que levou a uma expressão deficiente do gene. Considerando que a expressão de gp91-phox nos eosinófilos do paciente encontrava-se normal, propõe-se mais uma vez que os eosinófilos possam ter seu próprio mecanismo de expressão de gp91-phox, independente de PU.1 (YANG et al, 2000b), sendo este, um mecanismo diferencial sobre o controle da expressão gênica de gp 91- phox em eosinófilos.

Em nossa análise dos experimentos tipo “Slot blot”, depois da diferenciação das células HL-60 clone 15, observamos um aumento dos níveis estáveis de RNAm tanto de gp91 como p47 phox, em relação às células em condições basais, o que significa que existe uma estabilidade na regulação, que leva à acumulação destes RNAs. Outros mecanismos pós transcricionais, tais como um aumento na tradução, mobilidade de cálcio intracelular, fosforilação de proteínas, poderiam contribuir para uma melhor avaliação passo a passo desde fenômeno, e poder discriminar se existem ou não verdadeiras diferenças na expressão gênica. Estudos de regulação gênica mediada por citocinas em granulócitos, macrófagos, em células monocíticas THP-1 e em células de leucemia mielóide (CASSATELLA, 1989), demonstraram uma indução de CYBB por IFN- γ , TNF- α que foi pelo menos em parte transcricional. Assim, células da linhagem mielomonocítica provavelmente regulam positivamente a expressão de gp91-phox em resposta ao IFN- γ , TNF- α por mecanismos transcricionais e pós transcricionais. O IFN- γ , aumenta a expressão de vários genes

incrementando tanto a taxa de transcrição como a estabilidade do RNAm (CONDINO-NETO, 2000). O ensaio de “nuclear run-on” demonstrou que houve um aumento na taxa de transcrição dos genes CYBB e NCF1 que codificam gp91-phox e p47-phox respectivamente, o qual indica, que o mecanismo de regulação do sistema NADPH oxidase de nosso modelo é pelo menos transcricional.

Independente do método de amplificação por PCR, várias técnicas são usadas para a detecção dos produtos de PCR, tais como eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida e coloração com brometo de etídio ou prata, além de radioisótopos. Todas estas técnicas precisam uma intensiva e laboriosa manipulação pós PCR, com o uso de químicos perigosos e com grande potencial de contaminação no laboratório. A introdução de um novo método baseado em fluorescência, é capaz de quantificar os produtos de PCR em tempo real. Esta técnica é segura, sensível e mede a acumulação dos produtos de PCR durante a fase exponencial da reação. Sendo muito mais rápida que o PCR convencional, e desenhada para prover informação imediata, dispensando manipulações pós PCR. Nas cinéticas da expressão por RT-PCR de gp91-phox em células HL-60 clone 15 estimuladas com IFN- γ e TNF- α , encontramos uma expressão significativa nas primeiras 48 horas da cultura, como havia sido demonstrado em experimentos anteriores. Queremos ressaltar que os resultados encontrados pela metodologia de PCR em tempo real foram mais precisos, seguros e de alta reprodutibilidade, em comparação ao PCR convencional, portanto, destacamos a correlação que existe entre a intensidade de sinal com a quantidade de produto amplificado em cada ponto da cinética. Os resultados da PCR convencional tiveram baixa sensibilidade e baixa resolução, deste modo, recomendamos o método de PCR em tempo real como o indicado para este tipo de análise, onde há pontos que a PCR convencional não consegue definir claramente.

Embora os glicocorticóides sejam largamente utilizados, os mecanismos moleculares que controlam seus efeitos terapêuticos, ainda não estão totalmente esclarecidos. Os glicocorticóides podem atuar em parte por meio da indução de genes antiinflamatórios, ou pela inibição de alguns genes inflamatórios, como das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ (ADCOCK, 2001). Os glicocorticóides ligam-se a receptores citosólicos, os quais se ativam e translocam para o

núcleo, onde induzem a transcrição de genes ligando-se especificamente ao DNA na região promotora dos genes ou reduzindo a transcrição do gene por transrepressão (ADCOCK, 2000).

A regulação da expressão gênica por glicocorticóides envolve mecanismos complexos, que não dependem apenas da presença de seus receptores (GRs) ou de seus elementos responsivos específicos no DNA. Interações diretas proteína-proteína têm sido demonstradas entre o GR e o AP-1 (Ativador protéico-1), o componente p65 do fator nuclear kappa B (NF- κ B), e com o NF-AT (fator nuclear de células T ativado), todos estes fatores de transcrição que regulam a expressão de outros genes alvo inflamatórios (ADCOCK e ITO, 2000). Muitas respostas inflamatórias são mediadas por meio do NF- κ B (BALDWIN, 2001). O NF- κ B é um heterodímero, composto de duas subunidades, uma de 50 kDa (p50; NF κ B1) e outra de 65 kDa (p65; RelA), o qual, encontra-se no citoplasma em forma inativa (podendo ser ativado por ésteres de forbol na presença de inibidores de síntese protéica) e associado a uma proteína inibitória de sua atividade, conhecida como I κ B. No núcleo, o NF- κ B liga-se a elementos alvo no DNA e ativa a transcrição dos genes envolvidos na resposta inflamatória, crescimento celular e apoptose (BALDWIN, 2001).

O NF- κ B participa da proliferação celular, transformação e desenvolvimento de tumor. Vários estudos têm demonstrado, que a inibição do NF- κ B em linfoma de células B e câncer cerebral levam a apoptose celular , e que a expressão ectópica de RelC determina a sobrevivência celular (LIM et al., 2001). O NF- κ B ativado protege vários tipos de células da apoptose. O NF- κ B também estimula a expressão de enzimas, cujos produtos contribuem para a patogênese do processo inflamatório, incluindo a forma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS), que gera óxido nítrico (NO), e a ciclooxigenase induzível (COX-2), que gera prostanóides (PAHL, 1999). MATSUMURA et al. (2001) verificaram que a dexametasona bloqueia a expressão da óxido nítrico sintase (iNOS), em parte, por meio da inibição da ativação do NF- κ B, resultando em uma diminuição de óxido nítrico

Estudos realizados por vários grupos demonstraram que os glicocorticóides inibem o sistema NADPH oxidase fagocítico humano, mas sua contribuição na regulação gênica deste processo permanece pouco conhecida (MARUMO, 1998; DANDONA, 1999;

CABRERA, 2001). Estudos realizados por nosso grupo (CONDINO-NETO et al., 1998) em células THP-1 diferenciadas com citocinas (IFN- γ e TNF- α) determinaram que, a inibição do sistema NADPH oxidase pela dexametasona foi, pelo menos em parte, secundária à inibição da atividade transcricional dos genes gp91-phox e p47-phox.

Neste estudo, a dexametasona (1 μ M) inibiu significativamente a liberação de superóxido por células HL-60 clone 15, quando adicionada à cultura 24 horas antes das citocinas IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml). Além disto, as células HL-60 clone 15 cultivadas com IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml) apresentaram maior liberação de superóxido estimulada por PMA, quando comparado às células controle. Estes resultados foram confirmados ao nível molecular encontrando que a dexametasona (1 μ M) igualmente inibiu significativamente a expressão do gene gp91-phox quando adicionada à cultura 24 horas antes das citocinas IFN- γ (100 U/ml) e TNF- α (1000 U/ml). Nas células diferenciadas com IFN- γ e TNF- α , a dexametasona (1 μ M) não inibiu a expressão do gene gp91-phox, quando administrada após as citocinas. Estes resultados ressaltam claramente que existe uma correlação entre a análise bioquímica medida pela atividade NADPH oxidase com a expressão gênica de gp91-phox. Tais observações confirmam os resultados anteriores de nosso grupo com a linhagem celular THP-1 propondo que o sistema NADPH oxidase de células mielomonocíticas humanas pode ser bloqueado por corticosteróides antes, mas não após, completar seu desenvolvimento induzido pelas citocinas IFN- γ e TNF- α (CONDINO-NETO et al., 1998).

Outra possibilidade é que a dexametasona esteja inibindo algum fator de transcrição importante, por exemplo NF- κ B, que regula a expressão de vários genes inflamatórios. Existem vários mecanismos que podem explicar os efeitos inibitórios dos glicocorticóides na via do NF- κ B, entre eles, os relacionados com a indução de I κ B α . Por exemplo, AUPHAN et al. (1995) encontraram que a dexametasona induz a síntese do RNAm de I κ B α em células Jurkat que expressam receptores para glicocorticóides. A maior parte do I κ B α sintetizado *de novo* por efeito da dexametasona, está associado com o componente p65 nos complexos NF- κ B pré-existentes (SCHEINMAN et. al., 1995). CRINELLI et al. (2000), verificaram em células monocíticas, que a inativação do NF- κ B estava relacionada à diminuição da expressão do RNAm do TNF- α , sugerindo que a

supressão de TNF- α pela dexametasona ocorre a nível transcricional. Por sua vez, DSCHIETZIG et al. (2001) verificaram em tecido pulmonar murino, que a dexametasona diminui os níveis de NF- κ B nuclear, após estimulação celular com IL-1 β e TNF- α . Em nosso caso possivelmente a dexametasona atua no sítio de início de transcrição dos genes que codificam componentes do sistema NADPH oxidase. Estes sítios poderiam estar disponíveis para o efeito inibitório dos corticosteróides antes, mas não após completar a diferenciação destas células. Portanto, o mecanismo de corticorresistência pode ser explicado, pelo menos em parte, pela falha na inibição do gene gp91-phox. do sistema NADPH oxidase.

O estudo do NF- κ B em eosinófilos, seria muito importante, pois permitiria investigar os mecanismos fisiológicos envolvidos na corticorresistência destas células. Outra possibilidade poderia ser estudar a expressão dos receptores de corticosteróides em células eosinofílicas diferenciadas por IFN- γ e TNF- α . Isto, por que tem sido reportado que o TNF- α aumenta os níveis da isoforma GR β , correlacionando-se ao desenvolvimento da corticorresistência (WEBSTER et al, 2001). A expressão das isoformas de GR também pode ser uma ferramenta utilizada para tentar compreender melhor o mecanismo de corticorresistência.

O mecanismo molecular especificamente envolvido neste processo, assim como a interação potencial da dexametasona com os fatores de transcrição, no caso NF- κ B está em investigação em nosso laboratório. Além disto, propomos continuar investigando o efeito dos glicocorticóides sobre a atividade NADPH oxidase das células eosinofílicas, especificamente analisando o conteúdo de citocromo b₅₅₈ e a expressão dos genes que codificam os componentes gp91-phox e p47-phox, mediante análise transcricional por método de ensaio de “nuclear run-on” e o análise da expressão gênica por PCR em tempo real, além de analisar os níveis estáveis de RNAm por meio de ensaios tipo “slot blot”.

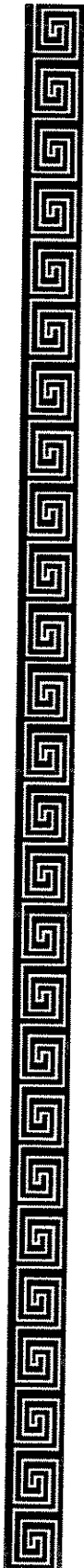
A cultura de leucócitos derivados de sangue de cordão umbilical na presença de IL-5 e IL-3 constitui um modelo para estudar a maturação dos eosinófilos *in vitro* e suas atividades biológicas, além de esclarecer a relação que existe entre a expressão gênica específica dos eosinófilos durante a doença alérgica e sua progressão. Igualmente, queremos ressaltar o modelo de células HL-60 clone 15, que apresenta uma considerável

vantagem em pesquisa que envolva os eosinófilos, porque elas se comportam de maneira similar aos eosinófilos de sangue periférico, quando tratadas com AB. Sua obtenção é mais fácil e não envolve coleta de sangue. Voluntários humanos com hiper eosinofilia poderiam ser uma fonte de eosinófilos, porém apresentam óbvias dificuldades em estudos de grande escala, requerendo grande quantidade de células. O uso de doadores humanos pode limitar tanto a quantidade como a viabilidade das células e além disso, os eosinófilos isolados de diferentes indivíduos podem não responder de igual maneira frente a um mesmo estímulo. Desta forma, as células HL-60 clone 15 são uma ferramenta útil para estudar aspectos do sistema NADPH oxidase em eosinófilos humanos, aspectos de sua regulação, assim como sua participação em diversas patologias humanas, como asma, rinite, dermatites e doenças parasitárias. Também ressaltamos que IFN- γ e TNF- α são suficientes para induzir a diferenciação das células HL-60 clone 15 numa linhagem eosinofílica ativando seu sistema NADPH oxidase. AB, IFN- γ e TNF- α ativam significativamente o sistema NADPH oxidase das células HL-60 clone 15. Isto sugere que AB, IFN- γ e TNF- α usam vias próprias além de vias comuns para estimular o sistema NADPH oxidase, o qual é regulado pelo menos em parte pelo estágio de desenvolvimento e diferenciação eosinofílica. Deste modo, a diferenciação eosinofílica e liberação de reativos intermediários do oxigênio deveriam ser considerados nas doenças inflamatórias crônicas nas quais, o IFN- γ e TNF- α estão envolvidos.

De outro lado, é importante conhecer e entender os diferentes eventos envolvidos nos processos inflamatórios alérgicos crônicos. No caso dos eosinófilos de indivíduos com asma por exemplo, se sabe que podem ativar e produzir mais O_2^- intracelular, do que os neutrófilos e de esta forma, contribuir com a patogênese da doença, de maneira que compreender os detalhes moleculares que regulam estes processos e os diferentes padrões de liberação regulada do O_2^- nos eosinófilos, pode contribuir ao desenvolvimento de novas terapias específicas que tem a finalidade de modular a secreção de mediadores na inflamação ocasionada por eosinófilos. O surgimento de novos fármacos que regulem a adesão celular, o recrutamento e a migração de células inflamatórias são esperados em médio prazo, assim como o bloqueio seletivo de fatores quimiotáticos, através de antagonistas de seus receptores.

Diante dos resultados, deste estudo pode-se concluir que este projeto deverá contribuir para o avanço do conhecimento sobre o desenvolvimento e regulação do sistema NADPH oxidase fagocítico humano e seus mecanismos reguladores da expressão gênica particularmente na linhagem mielóide, e especificamente dos eosinófilos humanos. Além disso, o modelo aqui proposto, viabiliza a análise da ação dos glicocorticóides sobre células da linhagem eosinofílica ativadas ou não, podendo contribuir para a compreensão da fisiopatologia e bases do tratamento de doenças alérgicas.

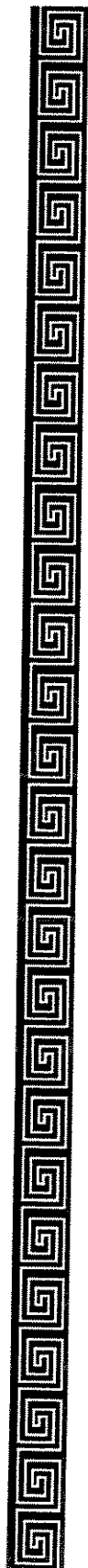
Novos estudos sobre o desenvolvimento e a regulação farmacológica do sistema NADPH oxidase em eosinófilos, proporcionará bases científicas para modular sua expressão em condições inflamatórias.



6 - CONCLUSÕES

Concluimos que:

1. As células HL-60 clone 15 se diferenciam numa linhagem eosinofílica quando tratadas com ácido butírico 0,5 mM, expressando um fenótipo eosinófilo maduro.
2. IFN- γ e TNF- α , induzem nas células HL-60 clone 15 a se diferenciar e expressar atividade NADPH oxidase expressão gênica para os componentes gp91-phox e p47-phox.
3. O sistema NADPH oxidase das células HL-60 clone 15 pode ser inibido por a dexametasona antes, mas não após, completar seu desenvolvimento induzido pelas citocinas IFN- γ e TNF- α .
4. Os leucócitos derivados de sangue de cordão umbilical diferenciam-se em células semelhantes a eosinófilos maduros na presença de IL-5 e IL-3, apresentam atividade oxidase e expressam o componente gp91-phox do sistema NADPH oxidase.



7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADCOCK IM. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther*, 14:211-9, 2001.
- ADCOCK IM, ITO K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis*, 55:256-66, 2000.
- AUPHAN, N., DIDONATO, J. A., ROSETTE, C., HELMBERG, A. and KARIN, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270: 286-90, 1995.
- BALDWIN AS, JR. Series introduction: the transcription factor NF-kappa B and human disease. *J Clin Invest*, 107:3-6, 2001.
- BABIOR, B.M., KUYER, R., CURNUTTE, J.T. Kinetics of activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem*, 263:1713-1718, 1988.
- BAEHNER, R.L., KUNKEL, L.M., MONACO, A.P., et al. DNA linkage analysis of X chromosome-linked chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:3398-3401, 1986.
- BHATTACHARYYA GKA, JOHNSON RA. *Statistical Concepts and Methods*. Wiley, Singapore: Bhattacharyya, G. K. and Johnson, R. A. Eds; 1977.
- BOLSCHER, B. G., KOENDERMAN, L., TOOL, A. T., STOKMAN, P. M., ROOS, D. NADPH:O2 oxidoreductase of human eosinophils in the cell-free system. *FEBS Lett*, 268: 269-273, 1990.
- BOYCE JA, FRIEND D, MATSUMOTO R, AUSTEN KF, OWEN WF. Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J Exp Med*, 182(1):49-57, 1995.
- BOYCE JA, FRIEND D, GURISH MF, AUSTEN KF, OWEN WF. Constitutive production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by hypodense mononuclear eosinophils developed in vitro from hybrid eosinophil/basophil granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6):2436-41, 1996

CABRERA E, VELERT MM, ORERO A, MARTINEZ P, CANTON E. [Effect of anti-inflammatory drugs, alone and combined with ofloxacin, on the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes]. *Rev Esp Quimioter*, 14(2):165-71, 2001.

CASSATELLA MA, HARTMAN L, PERUSSIA B, TRINCHIERI G. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells. *J Clin Invest*, 83(5):1570-9, 1989.

CELESTIN, J., ROTSCHKE, O., FALK, K., RAMESH, N., JABARA, H., STROMINGER, J., and GEHA, R.S. IL-3 induces B7.2 (CD86) expression and costimulatory activity in human eosinophils. *J Immunol*, 167: 6097-6104, 2001.

CHANOCK, S.J., EL BENNA, J., SMITH, R.M., BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*, 269:24519-24522, 1994.

COLLINS SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*, 70(5):1233-44, 1987.

COLLINS, P. D., MARLEAU, S., GRIFFITHS-JOHNSON, D. A., JOSE, P. J., WILLIAMS, T. J.. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med*, 182:1169-1174, 1995.

CONDINO-NETO A, NEWBURGER PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood*, 95(11):3548-54, 2000.

CONDINO-NETO, A., NEWBURGER, P.E. NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr virus transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the the oxidase system. *Arch Biochem Biophys*, 360:158-164, 1998.

CONDINO-NETO, A., WHITNEY, C., NEWBURGER, P.E. Dexamethasone but not Indomethacin Down-Regulates the Human NADPH Oxidase by Inhibiting the Expression of Genes Encoding Components of the NADPH Oxidase System. *J Immunol*, 161:4960-4967, 1998.

- CROSS, A.R., CURNUTTE, J.T., RAE, J., HEYWORTH, P.G. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease. **Blood Cells Mol Dis**, 22:90-95, 1996.
- CRINELLI, R., ANTONELLI, A., BIANCHI, M., GENTILINI, L., SCARAMUCCI, S. and MAGNANI, M. Selective inhibition of NF-kB activation and TNF-alpha production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. **Blood Cells Mol Dis**, 26: 211-22, 2000.
- CURNUTTE, J.T., SCOTT, P.J., MAYO, L.A. Cytosolic components of the respiratory burst oxidase: Resolution of four components, two of which are missing in complementing types of chronic granulomatous disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, 86:825-829, 1989.
- CURNUTTE, J.T., ORKIN, S.H., DINAUER, M.C. Genetic disorders of phagocyte function. In: NEINHUIS, A.W.; MAJERUS, P.W.; VARMUS, H. **The Molecular Basis of Blood Diseases**. Philadelphia: Stamatoyannopoulos, G.W.B. Saunders, 1994. p. 493-540.
- DAHL R, VENGE P, FREDENS K. Eosinophils. In: BARNES, P.J, ed. **Asthma: basic mechanisms and clinical management**. London: Academic Press 1992. p111 - 124.
- DANDONA P, MOHANTY P, HAMOUDA W, ALJADA A, KUMBKARNI Y, GARG R. Effect of dexamethasone on reactive oxygen species generation by leukocytes and plasma interleukin-10 concentrations: a pharmacodynamic study. **Clin Pharmacol Ther**, 66(1):58-65, 1999.
- DECHATELET, L. R., R. A. MIGLER, P. S. SHIRLEY, H. B. MUSS, P. SZEJDA, AND D. A. BASS. Comparison of intracellular bactericidal activities of human neutrophils and eosinophils. **Blood**, 52:609, 1978.
- DINARELLO CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, 77(8):1627-52, 1991.
- DINAUER, M.C., PIERCE, E.A., BRUNS, G.A.P., 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**, 86:1729-1737, 1990.

DOMAE, M., SAGARA, H., SAKAUE, M., FUKUDA, T., and KAMIKAWA, Y. The antiallergic drug oxatomide promotes human eosinophil apoptosis and suppresses IL-5-induced eosinophil survival. **J Allergy Clin Immunol**, 111: 567-572, 2003.

DSCHIETZIG, T., RICHTER, C., PFANNENSCHMIDT, G., BARTSCH, C., LAULE, M., BAUMANN, G. and STANGL, K. Dexamethasone inhibits stimulation of pulmonary endothelins by proinflammatory cytokines: possible involvement of a nuclear factor kappa B dependent mechanism. **Intensive Care Med**, 27: 751-6, 2001.

EGAN, R. W., ATHWAHL, D., CHOU, C. C., CHAPMAN, R. W., EMTAGE, S., JENH, C. H., KUNG, T. T., MAUSER, P. J., MURGOLO, N. J. and BODMER, M. W. Pulmonary biology of anti-interleukin 5 antibodies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92 Suppl 2: 69-73, 1997.

EKLUND, E.A., SKALNIK, D.G. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. **J Biol Chem**, 270:8267-8273, 1995.

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.

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**, 269:23431-23436, 1994.

EZEKOWITZ, R.A.B., ORKIN, S.H., NEWBURGER, P.E. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. **J Clin Invest**, 80:1009-1016, 1987.

FISCHKOFF SA, POLLAK A, GLEICH GJ, TESTA JR, MISAWA S, REBER TJ. Eosinophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. **J Exp Med**, 160(1):179-96, 1984

- FISCHKOFF SA. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. **Leuk Res**, 12(8):679-86, 1988.
- FRANCKE, U, HSIEH, C. L, FOELLMER, B E, LOMAX, K. J, MALECH, H. L, LETO, T. L. Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23 (NCF1). **Am J Hum Genet**, 47: 483-92, 1990.
- GABIG, T.G., CREAN, 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**, 85:804-811, 1995.
- 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.
- GREENBERG ME, GREENE LA, ZIFF EB. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. **J Biol Chem**, 260(26):14101-10, 1985.
- GRISTEIN, S, FURUYA, W. - Tyrosine phosphorylation and oxygen consumption induced by G proteins in neutrophils. **Am J Physiol**, 260: C1.019-27, 1991.
- GRUART V, TRUONG MJ, PLUMAS J, ZANDECKI M, KUSNIERZ JP, PRIN L, et al. Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. **Blood**, 79(10):2592-7, 1992
- HALLIWELL, B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. **Ann Rheum Dis**, 54:505-510, 1995.
- HASHIDA R, OGAWA K, MIYAGAWA M, SUGITA Y, MATSUMOTO K, AKASAWA A, et al. Gene expression accompanied by differentiation of cord blood-derived CD34+ cells to eosinophils. **Int Arch Allergy Immunol**, 125 Suppl 1:2-6, 2001
- HENDERSON, L. M., and J. B. CHAPPELL. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? **Eur J Biochem**, 217:973, 1993.

HENDERSON, L.M. and CHAPPELL, J.B. NADPH oxidase of neutrophils. **Biochim Biophys Acta Bio-Energetics**, 1273:87-107, 1996.

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**, 266:6152-6158, 1991.

HORIE, S., GLEICH, G. J., KITA, H. Cytokines directly induce degranulation and superoxide production from human eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, 98:371-381, 1996.

HUA J, HASEBE T, SOMEYA A, NAKAMURA S, SUGIMOTO K, NAGAOKA I. Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 cells to neutrophil lineage. **J Leukoc Biol**, 68(2):216-24, 2000.

HUA, J., HASEBE, T., SOMEYA, A., NAKAMURA, S., SUGIMOTO, K., NAGAOKA, I. Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 clone 15 cells to eosinophilic lineage. **Inflamm Res**, 50:156-167, 2001.

ISHIBASHI F, MIZUKAMI T, KANEGASAKI S, MOTODA L, KAKINUMA R, ENDO F, NUNOI H. Improved superoxide-generating ability by interferon gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in CYBB gene. **Blood**, 98(2): 436-41, 2001.

ISHIZUKA, T., MORITA, K., HISADA, T., ANDO, S., ADACHI, M., DOBASHI, K., and MORI, M. The direct effect of interferon-gamma on human eosinophilic leukemia cell lines: the induction of interleukin-5 mRNA and the presence of an interferon-gamma receptor. **Inflammation**, 20:151-163, 1996.

JESAITIS, A.J., BUESCHER, E.S., HARRISON, D., et al. Ultrastructural localization of cytochrome *b* in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. **J Clin Invest**, 85:821-835, 1990.

KANKAANRANTA, H., LINDSAY, M.A., GIEMBYCZ, M.A., ZHANG, X., MOILANEN, E., and BARNES, P.J. Delayed eosinophil apoptosis in 23 asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 106:77-83, 2000.

- KAY, A.B. Advances in Immunology: Allergy and Allergic Disease. *N Engl J Méd*, 344:11 109-113, 2001.
- KJELDSSEN, L., BANTON, 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 fractionation. *Blood*, 82:3183-3191, 1993.
- KNAUS, 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*, 269:221-223, 1995.
- KOBAYASHI, T., J. M. ROBINSON, AND H. SEGUCHI. Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J Cell Sci*, 111:81,1998.
- KURIBAYASHI, F., KUMATORI, A., SUZUKI, S., NAKAMURA, M., MATSUMOTO, T., TSUJI, Y.. Human peripheral eosinophils have a specific mechanism to express gp91-phox, the large subunit of cytochrome b558. *Biochem Biophys Res Commun*, 209, 146-152, 1995.
- LACY, P. and MOQBEL, R. Eokines: synthesis, storage and release from human eosinophils. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 92 Suppl 2: 125-33, 1997.
- LACY P, ABDEL-LATIF D, STEWARD M, MUSAT-MARCU S, MAN SF, MOQBEL R. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects. *J Immunol*, 170(5):2670-9, 2003.
- LAMPINEN, M., CARLSON, M., HAKANSSON, L. D. and VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*, 59. 793-805, 2004.
- LETO, T.L., LOMAX, K.J., VOLPP, B.D., et al. Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science*, 248:727-730, 1990.
- LINDSAY, M.A., GIEMBYCZ, M.A. Signal transduction and activation of the NADPH oxidase in eosinophils. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 92:115-123, 1997.

- LIM, J. W., KIM, H. and KIM, K. H. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab Invest*, 81: 349-60, 2001
- LOMAX, K.J., LETO, T.L., NUNOI, H., GALLIN, J.I., MALECH, H.L. Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science*, 245:409-412, 1989.
- LÓPEZ, J A, NEWBURGER, PE AND CONDINO-NETO, A. The Effect of IFN- γ and TNF- α on the Eosinophilic Differentiation and NADPH Oxidase Activation of Human HL-60 Clone 15 Cells. *J Int & Cyt Res*, 23: 737-744, 2003
- 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*, 271:18203-18210, 1996.
- LUTTMANN, W., DAUER, E., SCHMIDT, S., MARX O., HOSSFELD, M., MATTHYS, H., VIRCHOW, J. Effects on Interferon- γ and Tumour Necrosis Factor- α on CD95/Fas Ligand-Mediated Apoptosis in Human Blood Eosinophils. *Scand J Immunol*, 51:54-59, 2000.
- MARUMO T, SCHINI-KERTH VB, BRANDES RP, BUSSE R. Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22 phox mRNA expression in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension*, 32(6):1083-8, 1998.
- MATSUMURA, M., KAKISHITA, H., SUZUKI, M., BANBA, N. and HATTORI, Y. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by inhibiting NF-kappaB in vascular smooth muscle cells. *Life Sci*, 69: 1067-77, 2001.
- MCCORD, J., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244:6044-6055, 1969.
- MCCORD, J.M., GAO, B., LEFF, J., FLORES, S.C. Neutrophil-generated free radicals: possible mechanisms of injury in adult respiratory distress syndrome. *Envir Health Perspect*, 102 Suppl 10:57-60, 1994.

- MCPHAIL, L.C., SHIRLEY, P.S., CLAYTON, C.C., SNYDERMAN, R. Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. *J Clin Invest*, 75:1735-1739, 1985.
- MEAGHER LC, COUSIN JM, SECKL JR, HASLETT C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol*, 156:4422-4428, 1996.
- MEIJERINK, J., MANDIGERS, C., VAN DE LOCHT, L., TONNISSEN, E., GOODSID, F. and RAEMAEEKERS, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn*, 3: 55-61, 2001.
- NASMITH, P. E; MILLS, G. B., GRINSTEIN, S. Guanine nucleotides induce tyrosine phosphorylation and activation of the respiratory burst in neutrophils. *Biochem J*, 257: 893-7, 1989.
- NEWBURGER, P.E., EZEKOWITZ, R.A.B., WHITNEY, C., WRIGHT, J., ORKIN, S.H. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5215-5219, 1988.
- NEWBURGER, P.E., DAI, Q., 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*, 266:16171-16177, 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*, 94:1205-1211, 1994.
- NUNOI, H., ROTROSEN, D., GALLIN, J.I., MALECH, H.L. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science*, 242:1298-1301, 1988.

NUTKU E., ZHUANG Q, SOUSSI-GOUNNI A, ARIS F, MAZER BD, HAMID Q. Functional expression of IL-12 receptor by human eosinophils: IL-12 promotes eosinophil apoptosis. **J Immunol**, 167:1039-1046, 2001.

OCHIAI K, OMURA M, MOCHIZUKI A, ITO M, TOMIOKA H. Human umbilical vein endothelial cells support interleukin-3- and interleukin-5-induced eosinophil differentiation from cord blood CD34+ cells. **Int Arch Allergy Immunol**, 120 Suppl 1:2-6, 1999.

OHTSU H, YAMAUCHI K, YOSHIE O, TANNO Y, SAITO H, HAYASHI N, et al. The effect of cytokines on the differentiation of an eosinophilic leukemia cell line (EoL-1) is associated with down regulation of c-myc gene expression. **Cell Struct Funct**, 8(2):125-33, 1993.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, 18: 6853-66, 1999.

PALLANSCH L, BESWICK H, TALIAN J, ZELENKA P. Use of an RNA folding algorithm to choose regions for amplification by the polymerase chain reaction. **Anal Biochem**, 185(1):57-62, 1990.

PARKOS, C.A., ALLEN, R.A., COCHRANE, C.G., JESAITIS, A.J. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides of 91,000 and 22,000 relative molecular weights. **J Clin Invest**, 80:732-742, 1987.

PARKOS, C.A., ALLEN, R.A., COCHRANE, C.G., JESAITIS, A.J. The quaternary structure of the plasma membrane b-type cytochrome of human granulocytes. **Biochim Biophys Acta** 932:71-83, 1988a.

PARKOS, C.A., DINAUER, M.C., WALKER, L.E., ALLEN, R.A., JESAITIS, A.J., ORKIN, S.H. The primary structure and unique expression of the 22 kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. **Proc Natl Acad Sci USA**, 85:3319-3323, 1988b.

PLAETINCK G, VAN DER HEYDEN J, TAVERNIER J, FACHE I, TUYSENS T, FISCHKOFF S, et al. Characterization of interleukin 5 receptors on eosinophilic sublines from human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. **J Exp Med**, 172:683-91, 1990.

- QUIE, P.G. Chronic granulomatous disease of childhood: A saga of discovery and understanding. **Pediatr Infect Dis J**, 12:395-398, 1993.
- 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.
- RESNIK, M.B and, WELLER, P.F. Mechanisms of eosinophil recruitment. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 8: 349-55, 1993.
- RIOS, JBM; CARVALHO LP. **Alergia Clínica – Diagnóstico e Tratamento**. 1ª ed. Rio de Janeiro, 1995
- ROOS, D., DE BOER, M., KURIBAYASHI, F., et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Blood**, 87:1663-1681, 1996.
- ROSENBERG HF, DYER KD, LI F. Characterization of eosinophils generated *in vitro* from CD34+ peripheral blood progenitor cells. **Exp Hematol**, 24:888-93, 1996.
- ROTHENBERG, M. E. Eosinophilia. **N Engl J Méd**, 338: 1592-600, 1998.
- ROYER-POKORA, B., KUNKEL, L.M., MONACO, A.P., et al. Cloning the gene for an inherited disorder -- chronic granulomatous disease -- on the basis of its chromosomal location. **Nature**, 322:32-38, 1986.
- SCHLEIMER, R.P. Glucocorticosteroids. Their mechanisms of action and use in allergic diseases. In: MIDDLETON, E.; REED, C. E.; ELLIS, E. F. **Allergy principles and practice**. St Louis: Mosby, 1993. p.893-925.
- SCOTT, E.W., SIMON, M.C., ANASTASI, J., SINGH, H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. **Science**, 265:1573-1577, 1994.
- SEGAL, A.W., JONES, O.T.G., WEBSTER, D., ALLISON, A.C. Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. **Lancet**, ii:446-449, 1978.

SEGAL, A.W., ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends Biochem Sci**, 18:43-47, 1993.

SHALIT, M., SEKHSARIA, S., MALECH, H. L. Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. **Cell Immunol**, 160:50-57, 1995.

SHAKOORY, B. MATTHEW FITZGERALD, S., LEE S. A., CHI D. and KRISHNASWAMY G. The Role of Human Mast Cell-Derived Cytokines in Eosinophil Biology. **J Int & Cyt Res**, 24:271-281, 2004.

SCHEINMAN, R. I., COGSWELL, P. C., LOFQUIST, A. K. and BALDWIN, A. S., JR. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, 270: 283-6, 1995.

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**, 266:16736-16744, 1991.

SMITH, L.T., HOHAUS, S., GONZALEZ, D.A., DZIENNIS, S.E., TENEN, D.G. PU.1 (Spi-1) and C/EBP β regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. **Blood**, 88:1234-1247, 1996.

SOMEYA, A., K. NISHIJIMA, H. NUNOI, S. IRIE, AND I. NAGAOKA. Study on the superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils: comparison of the NADPH oxidase components. **Arch Biochem Biophys**, 345:207, 1997.

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**, 269:32626-32633, 1994.

STEVEN, A., FISCHKOFF, S.A., POLLAK A., GLEICH, G.J., TESTA, J.R., MISAWA, S., REBER, T.J. Eosinophilic Differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. **J Exp Med**, 160:179-196, 1984.

SUBRAHMANYAM YV, BASKARAN N, NEWBURGER PE, WEISSMAN SM. A modified method for the display of 3'-end restriction fragments of cDNAs: molecular profiling of gene expression in neutrophils. **Methods Enzymol**, 303:272-97, 1999.

SUPERTI-FURGA, 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**, 1007:237-242, 1989.

SUR, S., ADOLPHSON, C.R., GLEICH, G.J. Eosinophils. In: MIDDLETON, E.; REED, C.E.; ELLIS, E.F.; ADKINSON, N.F.; YUNGINGER, J.W.; BUSSE, W.W **Allergy Principles and Practice**, St.Louis: Mosby, 1993. p. 169-200.

TAKAMOTO, M., SUGANE, K. Synergism of IL-3, IL-5, and GM-CSF on eosinophil differentiation and its application for an assay of murine IL-5 as an eosinophil differentiation factor. **Immunol Lett**, 45, 43-46, 1995.

The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. **N Engl J Med**, 324:509-5160, 1991.

TRIGGIANI M, CALABRESE C, GRANATA F, GENTILE M, MARONE G. Metabolism of lipid mediators in human eosinophils. In: Marone G, ed. Human eosinophils. **Biological and clinical aspects**, Basel: Karger;77 * 98,2000.

VIGNOLA AM. Evaluation of Apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in muco-sal Biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. **J Allergy Clin Immunol**, 103: suppl.4:563-73, 1999.

VOLPP, B.D., NAUSEEF, W.M., CLARK, R.A. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. **Science**, 242:1295-1297, 1988.

WEBSTER, J. C., OAKLEY, R. H., JEWELL, C. M. and CIDLOWSKI, J. A.. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98: 6865-70, 2001.

- WELLER, P. F. Eosinophils: structure and functions. **Curr Opin Immunol**, 6:85-90, 1994.
- 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 *src* homology 3 domains. **Biochem J**, 296:557-561, 1993.
- WISEMAN, H., HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem J**, 313:17-29, 1996.
- WOODMAN, R.C., ERICKSON, R.W., RAE, J., JAFFE, H.S., CURNUTTE, J.T. Prolonged recombinant interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease: Evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. **Blood**, 79:1558-1562, 1992.
- WOODMAN, R.C., NEWBURGER, P.E., ANKLESARIA, P., 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**, 85:231-241, 1995.
- YAGISAWA, M., A. YUO, M. YONEMARU, S. IMAJOH-OHMI, S. KANEGASAKI, Y. YAZAKI, AND F. TAKAKU.. 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, 1996.
- YAMAGUCHI Y, SUDA T, OHTA S, TOMINAGA K, MIURA Y, KASAHARA T. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. **Blood**, 78(10):2542-7, 1991.
- YANG D, SUZUKI S, HAO LJ, FUJII Y, YAMAUCHI A, YAMAMOTO M, et al. Eosinophil-specific regulation of gp91(phox) gene expression by transcription factors GATA-1 and GATA-2. **J Biol Chem**, 275(13):9425-32, 2000a.
- YANG, Z., WARA-ASWAPATI, N., CHEN, C., TSUKADA, J., AURON, P.E NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether. **J Biol Chem**, 275, 21272-21277, 2000b.

YOSHIE O, MAJIMA T, SAITO H. Membrane oxidative metabolism of human eosinophilic cell line EoL-1 in response to phorbol diester and formyl peptide: synergistic augmentation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. **J Leukoc Biol**, 45(1):10-20, 1989.

ZARDINI DM, HEUSCHLING P, GALLOIS A, BUEB JL, TSCHIRHART EJ. Human umbilical cord blood-derived eosinophils cultured in the presence of IL-3 and IL-5 respond to fMLP with $[Ca^{2+}]_i$ variation and O_2^- production. **J Immunol Methods**, 205(1):1-9, 1997.

ZHAN, S., VAZQUEZ, N., WIENTJES, F.B., 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**, 88:2714-2721, 1996.