

Atividade da NADPH oxidase em granulócitos e células mononucleares de adolescentes e crianças asmáticos segundo a gravidade da doença

NADPH oxidase activity of granulocytes and mononuclear cells of asthmatic children according to the disease severity

Lívia E. Marçal¹, Jussara Rehder², Antônio Condino-Neto³

1 - Aluna de Pós-graduação em Pediatria (Mestrado), Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP; 2 - Bióloga - UNICAMP; 3 - Professor Assistente Doutor do Departamento de Pediatria da FCM - UNICAMP - Centro de Investigação em Pediatria e Depto. de Pediatria - FCM - UNICAMP, Campinas, SP

Resumo

Objetivo: Investigar a liberação espontânea e estimulada (com forbol miristato acetato - PMA) de superóxido por granulócitos e células mononucleares de adolescentes e crianças asmáticos classificadas segundo os critérios do relatório Iniciativa Global para Asma (GINA) de 1997.

Métodos: Selecionamos 30 pacientes de seis a quinze anos, e os classificamos como tendo asma intermitente leve (AIL, n=9), persistente leve (APL, n=8), persistente moderada (APM, n=7) e persistente grave (APG, n=6). Os granulócitos e células mononucleares foram fracionados a partir de amostras do sangue periférico por gradiente de densidade descontínuo. A cinética de liberação de superóxido (0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos) foi avaliada segundo a redução do citocromo c, especificamente inibida pela superóxido dismutase. Os resultados foram comparados com os de 18 adultos saudáveis por análise de variância.

Resultados: A liberação espontânea de superóxido pelos granulócitos foi significativamente maior, aos 25 minutos, nos grupos APL, APM e APG comparado aos grupos de indivíduos saudáveis e AIL ($p < 0,05$), aos 45 minutos nos grupos APL e APM e aos 60 minutos nos grupos APG.

A liberação de superóxido pelos granulócitos estimulados com PMA, foi significativamente maior nos grupos APM e APG que nos indivíduos saudáveis, em todos os tempos. Não houve diferença significativa na liberação de superóxido por células mononucleares, estimuladas ou não com PMA, entre os diversos grupos de asmáticos e indivíduos saudáveis.

Conclusões: Há tendência de maior liberação de superóxido por granulócitos de pacientes com formas mais graves de asma, o que pode constituir fator de risco para dano pulmonar. Este novo dado quanto à fisiopatologia da asma pode estimular o desenvolvimento de novos agentes de modulação farmacológica, contribuindo assim para ampliação

Discussão

Os reativos intermediários do oxigênio estão implicados no dano tecidual consequente aos processos inflamatórios crônicos, como na asma. Seus efeitos adversos nesta doença incluem contração da musculatura lisa brônquica, aumento da permeabilidade vascular, geração de fatores quimiotáticos e peroxidação lipídica, levando à produção de mediadores secundários com efeito broncoconstritor⁶.

O critério de avaliação de gravidade adotado obedeceu à classificação proposta pelo GINA (1997)⁷, que se baseia nos seguintes padrões: frequência de sintomas, limitação da atividade física, frequência de exacerbações, sintomas noturnos e função pulmonar. Este estudo mostra que em crianças asmáticas com sintomas persistentes, ocorre maior liberação espontânea ou estimulada de ânion superóxido por granulócitos quando comparada à de indivíduos saudáveis ou com asma intermitente. Estes resultados demonstram a implicação da produção exacerbada deste radical livre na lesão pulmonar dos pacientes com sintomas frequentes, mesmo naqueles classificados como persistentes leves.

Jarjour e Calhoun¹³ observaram associação semelhante entre a produção espontânea de superóxido por leucócitos recuperados das vias aéreas de adultos asmáticos com volume expiratório forçado no primeiro segundo inferior a 80% do previsto. Estes autores também correlacionaram sintomas noturnos de asma com aumento de liberação de superóxido por leucócitos totais do espaço aéreo e queda do fluxo expiratório¹⁴. Kato *et al*¹⁵ demonstraram que polimorfonucleares de crianças asmáticas produzem mais superóxido do que os de controles saudáveis, e que esta produção é ainda maior durante a crise aguda.

Não encontramos diferença na liberação de superóxido por células mononucleares, estimuladas ou não com PMA. Supomos que este achado pode ter sido influenciado pela

do arsenal terapêutico da doença.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2000; 23(2):58-65 asma, radicais livres, NADPH oxidase, superóxido, burst oxidativo, crianças.

Abstract

Objective: To investigate the spontaneous and PMA-stimulated superoxide release by peripheral blood granulocytes and mononuclear cells from asthmatic children classified according to GINA/NIH (1997) criteria.

Methods: 30 patients were selected (6 to 15 years of age) and classified as suffering from mild intermittent (MI, n=9), mild persistent (MIP, n=8), moderate persistent (MOP, n=7) and severe persistent asthma (SP, n=6). Granulocytes and mononuclear cells were isolated from peripheral blood samples by discontinuous density gradient centrifugation. The superoxide release kinetics (0, 5, 15, 25, 45 and 60 minutes) was evaluated by the superoxide dismutase inhibitable reduction of cytochrome c. The results were compared to those obtained from healthy adults analysis of variance.

Results: The spontaneous release of superoxide by granulocytes was significantly higher at 25 minutes in the MIP, MOP and SP groups compared to healthy individuals or the MI group ($p < 0,05$); at 45 minutes in the MIP and MOP groups ($p < 0,05$) and at 60 minutes in the SP group ($p < 0,05$).

The PMA-stimulated release of superoxide by granulocytes, was significantly higher in the MOP and SP groups compared to healthy individuals at all sampling times ($p < 0,05$ in all situations). There was no significant difference in the PMA-stimulated or spontaneous superoxide release by mononuclear cells among all the asthmatic groups and healthy individuals.

Conclusions: There is a trend of higher superoxide release by granulocytes according to the patient's asthma severity. This represents a risk factor for pulmonary tissue injury. Pharmacological modulation should focus on this pathological finding.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2000; 23(2):58-65 Asthma, free radicals, NADPH oxidase, superoxide, oxidative burst, children.

Introdução

Radicais livres são definidos como quaisquer elementos químicos com existência própria, que contêm um ou mais elétrons não pareados¹. Os radicais superóxido e óxido nítrico são produzidos continuamente *in vivo*, com implicações fisiológicas e patológicas.

Os fagócitos contêm uma NADPH oxidase associada à membrana, a qual produz superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio (radicais livres), responsáveis por atividades microbiana, tumoricida, e inflamatória²⁻³. Durante os processos inflamatórios estes radicais livres constituem fator de risco para o dano oxidativo dos tecidos³.

presença de linfócitos entre os monócitos, já que os primeiros liberam pouco superóxido¹⁶. Majori *et al*¹⁷, estudando também células de sangue periférico, encontraram uma produção maior de superóxido por monócitos de pacientes com asma não controlada ou não tratada do que nos pacientes com asma controlada. Em seu processo de separação celular, os linfócitos foram removidos do gradiente mononuclear.

Estudos anteriores já haviam encontrado correlação entre o aumento da produção de superóxido e a hiperreatividade brônquica. Rahman *et al*¹⁸ observaram haver correlação entre tabagismo, exacerbações de doença pulmonar obstrutiva crônica, e crises agudas de asma com redução da capacidade antioxidante do plasma destes pacientes. Neijens *et al*¹⁹ obtiveram correlação positiva entre liberação de superóxido e histamina a partir de leucócitos totais do sangue periférico, com o grau de hiperreatividade brônquica em pacientes asmáticos. Renkema *et al*²⁰ encontraram correlação significativa entre o grau de hiperreatividade brônquica e liberação de superóxido por polimorfonucleares, em fumantes e ex-fumantes, sugerindo que reativos intermediários do oxigênio modulam o grau de hiperreatividade brônquica de pacientes não alérgicos com obstrução crônica ao fluxo aéreo.

Trabalhos mais recentes têm investigado as inter-relações do sistema NADPH oxidase de fagócitos com moléculas de adesão e fatores de transcrição. Nagata *et al*²¹ encontraram um efeito sinérgico da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e o fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) na estimulação de eosinófilos de pacientes atópicos. Chihara *et al*²² demonstraram o papel do RANTES (uma quimiocina da subfamília C-C) na inflamação alérgica por seu envolvimento na infiltração seletiva de eosinófilos e na ativação destas células pelo aumento de seu metabolismo oxidativo. Chen *et al*²³ relataram a ativação inapropriada do fator de transcrição NF-Kappa B (fator ativado por vários agentes incluindo os radicais livres) como um evento associativo do processo inflamatório presente na asma e em outras doenças.

Alguns autores vêm estudando o papel de drogas utilizadas no tratamento da asma na liberação de superóxido. Enzeamuzie e Al-Hage²⁴ demonstraram que algumas destas drogas inibem a liberação de superóxido por eosinófilos de sangue periférico. Calhoun *et al*²⁵ observaram que a liberação de superóxido por macrófagos alveolares de pacientes com asma alérgica diminui após sete dias de tratamento com zafirlucaste. No presente estudo, pacientes em uso de aminofilina, corticóides orais, antiinflamatórios não hormonais e anti-leucotrienos foram excluídos da amostra. O uso de corticóides inalatórios, embora já citado por Majori *et al*¹⁷ como inibidor da produção de superóxido por monócitos de sangue periférico de asmáticos, não foi critério de exclusão e portanto, tais drogas não foram descontinuadas.

A asma é uma doença pulmonar caracterizada por obstrução reversível, inflamação e hiperreatividade das vias aéreas⁴. Tais alterações se manifestam clinicamente por tosse, sibilância e dispnéia, sintomas que se correlacionam com a atividade inflamatória no pulmão⁵. À semelhança de outras doenças alérgicas, a asma é caracterizada por distúrbios do sistema imunológico e consequentes alterações funcionais de várias linhagens de células inflamatórias, dentre as quais os fagócitos.

Estudos anteriores mostram aumento da liberação de superóxido pelos fagócitos de asmáticos, com consequentes aumentos da hiperreatividade brônquica e da permeabilidade vascular, gerando fatores quimiotáticos e peroxidação lipídica, além da produção de mediadores secundários com efeito broncoconstritor⁶.

O objetivo deste estudo é investigar aspectos bioquímicos do sistema NADPH oxidase dos fagócitos polimorfonucleares e mononucleares de crianças asmáticas, segundo a gravidade da doença.

Casuística e métodos

Selecionamos 30 pacientes com asma atópica, entre seis e quinze anos de idade, de acordo com os critérios diagnósticos do relatório Iniciativa Global para Asma (GINA) (2) de 1997⁷. Destes, 60% foram do sexo feminino, 40% do sexo masculino, 50% brancos e 46,7% pardos e 3,3% negros.

O consentimento pós-informado por escrito foi obtido de todos os responsáveis pelos pacientes e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Foram selecionados 18 adultos saudáveis para o estudo de comparação com os grupos de asmáticos. A escolha do grupo de indivíduos saudáveis constituído por adultos e não por crianças pareados por idade com pacientes poderia ser alvo de críticas. No entanto, não há dados que sugiram que crianças saudáveis produzam mais reativos intermediários do oxigênio que adultos saudáveis⁸.

Os pacientes foram submetidos a anamnese, exame físico, espirometria, teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos comuns - ácaros, epitélio de cão e gato, fungos, poeira doméstica e barata e outros testes laboratoriais e radiológicos. Segundo os critérios do GINA-NIH, 1997⁷, os pacientes foram classificados em: intermitente leve (n=9), persistente leve (n=8), persistente moderado (n=7) e persistente grave (n=6).

Foram excluídos os pacientes que receberam corticosteróides sistêmicos ou antiinflamatórios não hormonais nos últimos 30 dias; os que tiveram infecções virais, bacterianas ou fúngicas nos últimos 30 dias, os que receberam hemoderivados nos últimos 30 dias, tabagistas; e com doenças concomitantes como imunodeficiências primária ou secundária, fibrose cística, deficiência de α_1 -antitripsina,

Os resultados obtidos até o momento são concordantes com os da literatura e mostram que granulócitos de pacientes asmáticos apresentam maior liberação de superóxido, espontânea ou estimulada. Um ponto a ser ressaltado neste estudo é a população estudada, composta por crianças e adolescentes, avaliados conforme a gravidade da doença. Foi possível demonstrar que a avaliação da produção deste radical livre por células do sangue periférico pode ser um parâmetro que correlaciona o processo inflamatório na asma com a gravidade da doença, uma vez que os granulócitos de pacientes com quadro clínico mais exacerbado apresentam maior liberação de superóxido que os de pacientes com formas mais leves e que os de indivíduos saudáveis. Estes achados sugerem uma possível utilização deste método pouco invasivo como monitorização indireta da inflamação e lesão pulmonar.

Referências bibliográficas

1. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-724.
2. Chanock SJ, El Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:24519-24522.
3. Henderson LM, Chappell JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta Bio-Energetics* 1996; 1273:87-107.
4. Boxer LA. The role of antioxidants in modulating neutrophil functional responses. *Adv. Exp. Med. Biol* 1990; 262:19-34.
5. Busse WW, Reed CE. *Allergy Principles and Practice*. E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Ellis, N. F. Adkinson, J. W. Yunginger, and W. W. Busse, editors. Mosby, Saint Louis; 1993. p. 1173-1201.
6. Hancock JT. Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules: their production and role in disease. *Brit. J. Biom. Sci.* 1997; 54:38-46.
7. *Practical Guide for the Diagnosis and Management of Asthma*. National Heart, Lung and Blood Institute/Expert Panel Report 2, Publication 97-4053, 1997.
8. Jöbis Q, Raatgeep HC, Hermans PWM, Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur. Respir. J.* 1997; 10:519-521.
9. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968;21 (Suppl. 97): 1-77.
10. McCord J, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte protein (hemocytin). *J. Biol. Chem* 1969; 244:6044-6055.
11. Milliken GA, Johnson DE. *Analysis of Messy Data. Volume I: Designed Experiments*. New York: Van Nostrand Reinhold Company; 1984. p. 322-350.
12. Montgomery Douglas C. *Design and Analysis of Experiments*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1991. p. 50-87.

presença de corpos estranhos em vias aéreas, anéis vasculares e outras doenças pulmo-nares obstrutivas crônicas.

Os pacientes e indivíduos sadios foram submetidos a coleta de 20 ml de sangue em ACD (*acid citrate dextrose*). Granulócitos e células mononucleares foram obtidos por meio de centrifugação em gradiente de densidade descontínuo (densidade de 1077 g/ml e 1119 g/ml)⁹. Após contagem, a suspensão de células foi ajustada para 2×10^7 células em solução de Hanks. A liberação do superóxido foi estimada pelo ensaio da redução do citocromo c, especificamente inibida pela SOD (superóxido dismutase)¹⁰, sendo estudada de duas formas: espontânea (leucócitos incubados apenas em solução de Hanks) e estimulada (leucócitos incubados com PMA - forbol miristato acetato 30nM). A absorvância da reação foi medida a 550nm nos tempos: 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos. A quantidade de superóxido liberado foi calculada aplicando-se o coeficiente de extinção de $21.100M^{-1} cm^{-1}$. Os resultados (nmol de superóxido/ 10^6 células) foram expressos pela diferença de absorvância dos tubos contendo SOD ou não.

Para comparar a liberação de superóxido entre os grupos para cada tipo de célula e cada reação, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas para experimento fatorial¹¹. A análise de variância foi feita separadamente para cada tipo de célula e reação (granulócitos espontâneos e estimulados e mononucleares espontâneos e estimulados). Foi utilizado o teste de Duncan¹², que compara todos os pares de médias dos grupos. Foi considerado o intervalo de confiança de 95%, nível de 5% de significância, ou seja, $p < 0,05$.

Resultados

A [figura 1](#) representa a média da cinética da liberação espontânea do superóxido em nmol de superóxido/ 10^6 granulócitos de pacientes agrupados segundo a gravidade da doença (asma intermitente leve-AIL, n=9, asma persistente leve APL, n=9; asma persistente moderada-APM, n=7 e asma persistente grave-APG, n=6) e de indivíduos sadios (n=18). No tempo 25 minutos a liberação de superóxido pelos granulócitos dos grupos APL, APM e APG foi significativamente maior que no grupo de indivíduos sadios e no grupo AIL ($p < 0,05$, teste de Duncan)¹².

A liberação espontânea de superóxido pelos granulócitos dos grupos APL e APM foi significativamente maior em relação aos sadios e ao grupo AIL no tempo 45 minutos ($p < 0,05$, teste de Duncan). No tempo 60 minutos, os granulócitos do grupo APG apresentaram liberação espontânea de superóxido significativamente maior que os de indivíduos sadios ($p < 0,05$, teste de Duncan)¹².

Não houve diferença na liberação de superóxido pelos granulócitos de asmáticos do grupo AIL e dos indivíduos sadios em todos os tempos ($p > 0,05$, em todas situações, teste de Duncan)¹².

13. Jarjour NN, Calhoun WJ. Enhanced production of oxygen radicals and asthma. *J. Lab. Clin. Med.* 1994;123:131-137.
14. Jarjour NN, Busse WW, Calhoun WJ. Enhanced production of oxygen radicals in nocturnal asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146:905-911.
15. Kato M, Nakano M, Morikawa A, Kimura H, Kuroi T. Ability of polymorphonuclear leukocytes to generate active oxygen species in children with bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* 1991; 95:17-22.
16. Condino-Neto A, Newburger PE. NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of Human Epstein-Barr virus transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. *Arch. Bio-chem. Biophys.* 1998; 360(2): 158-164.
17. Majori M, Vachier I, Godard P, Farce M, Bousquet J, Chanez P. Superoxide anion production by monocytes of corticosteroid-treated asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* 1998;11:133-138.
18. Rahman I, Morison D, Donaldson K, Nacnee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am. J. Crit. Care Med.* 1996; 154:1055-1060.
19. Neijns HJ, Raatgeep RE, Degenhart H, Duiverman EJ, Kerrebijn KF. Altered leukocyte response in relation to the basic abnormality in children with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984; 130:744-747.
20. Renkema TEJ, Postma DS, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffmann HF. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic airflow obstruction. *Agents Actions* 1989; 26:52-54.
21. Nagata M, Segwick JB, Busse WW. Synergistic Activation of Eosinophil Superoxide Anion Generation by VCAM-1 and GM-CSF. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114(suppl 1):78-80.
22. Chihara J, Kakazu T, Higashimoto I, Saito N, Honda K, Tsuda A, et al. RANTES Augments Eosinophil Lucigenin-Dependent Chemiluminescence. *Int Arch. Allergy Immunol* 1998;117(suppl 1):40-43.
23. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* 1999;45(1):7-17.
24. Ezeamuzie CI, Al-Hage M. Effects of Some Anti-Asthma Drugs on Human Eosinophil Superoxide Anions Release and Degranulation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1998; 115:162-168.
25. Calhoun WJ, Lavins BJ, Minkwitz MC, Evans R, Gleich GJ, Cohn J. Effect of Zafirlukast (Accolate) on Cellular Mediators of Inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157:1381-1389.

**Este trabalho foi financiado pela F.A.P.E.S.P.
F.A.P.E.S.P. (98/12144-5) (97/23954-8).**

Endereço para Correspondência

Lívia E. Marçal

Centro de Investigação em Pediatria

Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

CP 6111

13081-970 – Campinas - SP

E-mail: lmarcal@zaz.com.br.

A [figura 2](#) demonstra que a média de liberação de superóxido pelos granulócitos de pacientes as-máticos, estimulados com PMA, foi significativa-mente maior nos grupos APM (n=7) e APG (n=6) do que no grupo de indivíduos saudios (n=18) ($p < 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan)¹².

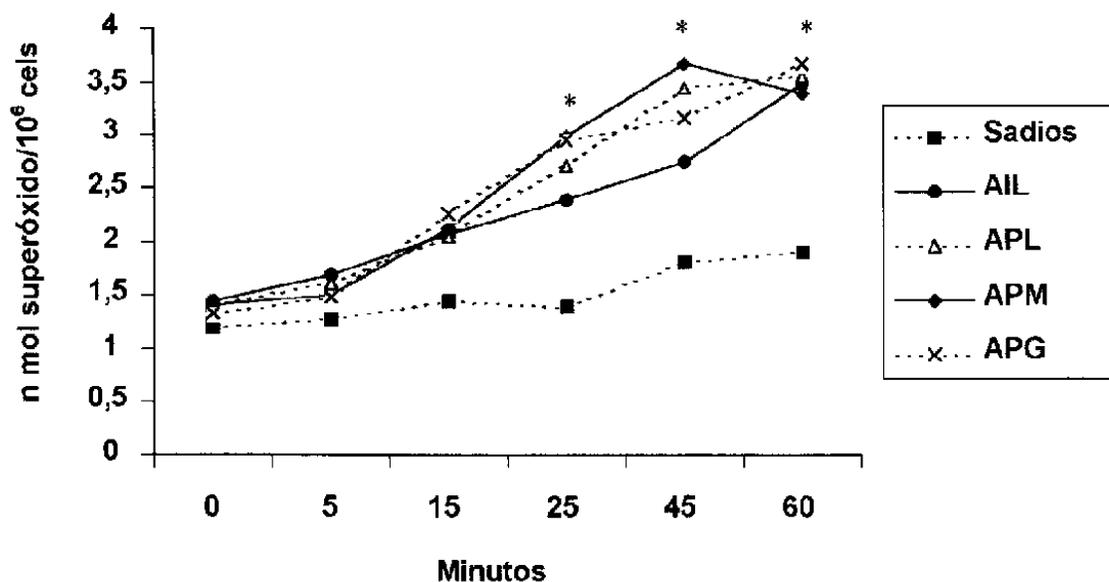
Observa-se uma tendência de maior liberação de superóxido pelos granulócitos estimulados dos grupos APM e APG em relação os grupos APL e AIL, mas esta diferença não teve significância estatística ($p > 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan)¹².

As [figuras 3 e 4](#) mostram que não houve diferença significativa nas médias de liberação espontânea ou estimulada com PMA de superóxido por células mononucleares entre os diferentes grupos de pacientes asmáticos (AIL, n=9; APL, n=8; APM, n=7 e APG, n=6) e os indivíduos saudios (n=18) ($p > 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan)¹².

Também não houve diferença significativa na liberação espontânea ou estimulada com PMA de superóxido por células mononucleares nos grupos de asmáticos entre si ($p > 0,05$, em todos os tempos e situações, teste de Duncan)¹².



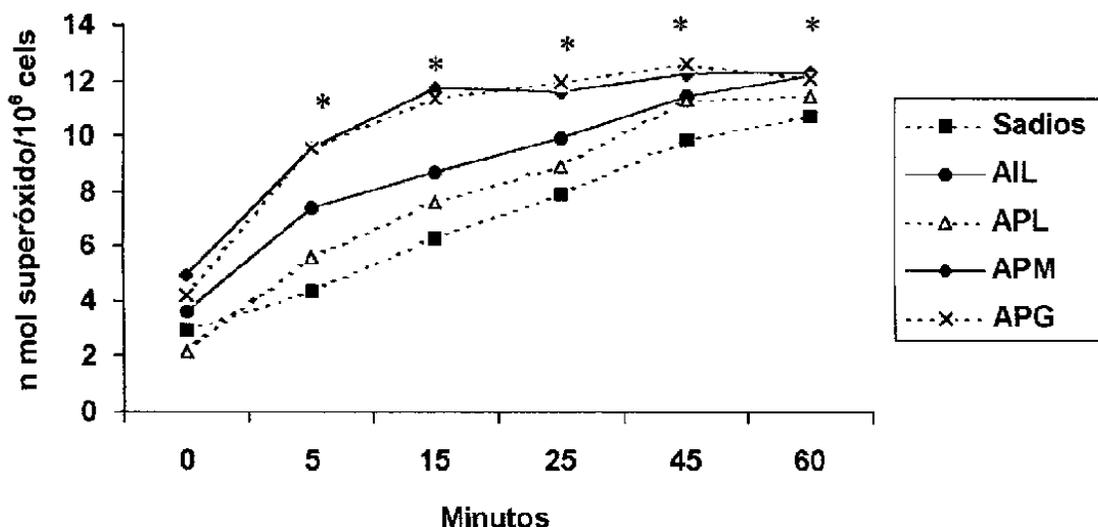
Figura 1 - Liberação espontânea de superóxido por granulócitos de crianças com asma intermitente leve (AIL, n=9), persistente leve (APL, n=8), persistente moderada (APM, n=7), persistente grave (APG, n=6) comparada à de indivíduos saudios (n=18). * - tempos nos quais $p < 0,05$ (teste de Duncan).



APM > Sadios
60 min - APG > Sadios

25 min - APL, APM
e APG > Sadios
45 min - APL e

Figura 2 - Liberação de superóxido por granulócitos estimulados com PMA (30 nM) de crianças com asma intermitente leve (AIL, n=9), persistente leve (APL, n=8), persistente moderada (APM, n=7), persistente grave (APG, n=6) comparada à de indivíduos saudáveis (n=18). * - tempos nos quais $p < 0,05$ (teste de Duncan).



APM e APG > Sadios em todos os tempos.

Figura 3 - Cinética da liberação espontânea de superóxido por células mononucleares de crianças com asma intermitente leve (AIL, n=9), persistente leve (APL, n=8), persistente moderada (APM, n=7), persistente grave (APG, n=6) comparada à de indivíduos saudáveis (n=18) ($p > 0,05$, teste de Duncan).

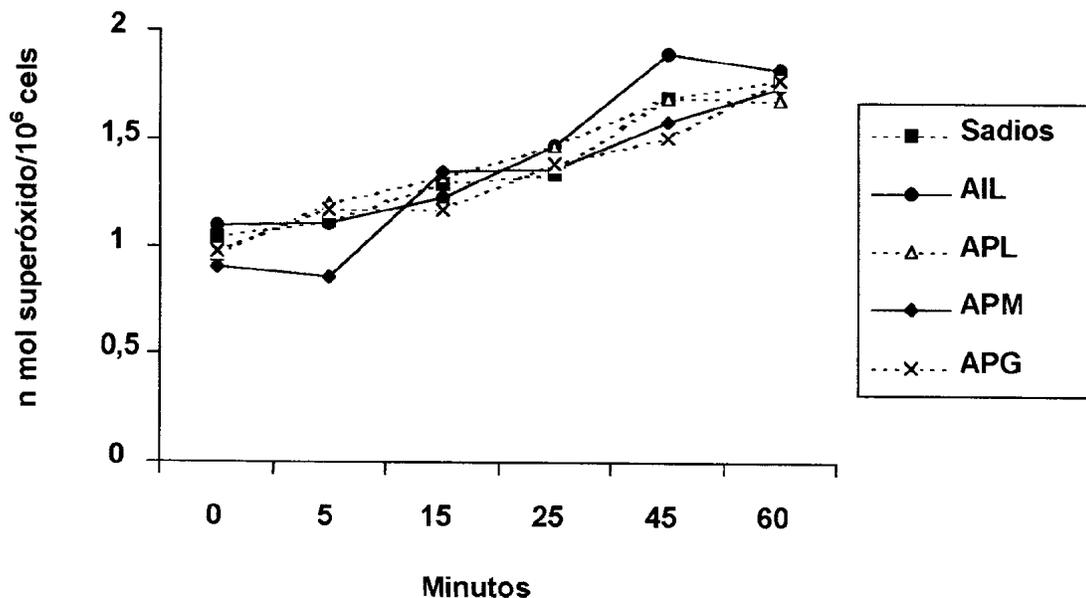
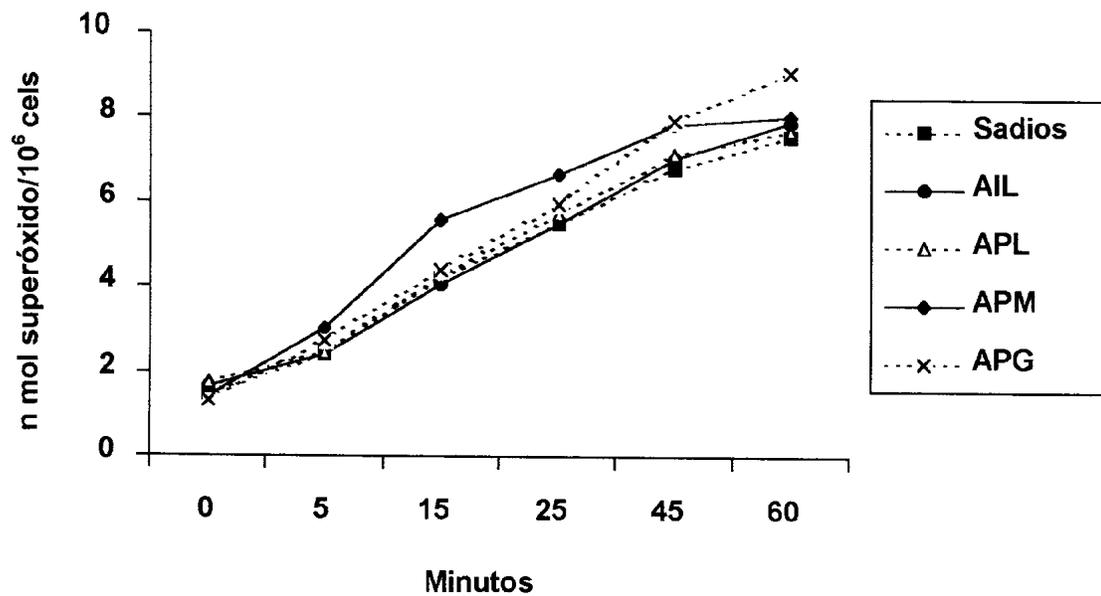


Figura 4 - Cinética da liberação de superóxido por células mononucleares estimuladas com PMA (30 nM) de crianças com asma intermitente leve (AIL, n=9), persistente leve (APL, n=8), persistente moderada (APM, n=7), persistente grave (APG, n=6) comparada à de indivíduos saudáveis (n=18) ($p > 0,05$, teste de Duncan).



[\[Home Page SBAI\]](#) [\[Índice Geral\]](#) [\[Índice do Fascículo\]](#)

A Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia.
Copyright 1998 - SBAI - Av. Prof. Ascendino Reis, 455 - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 04027-000