

WALMIR CUTRIM ARAGÃO FILHO

**O PAPEL DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B)
E DO EIXO IL-12/23-IFN- γ NA ATIVAÇÃO DO
SISTEMA NADPH OXIDASE**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

WALMIR CUTRIM ARAGÃO FILHO

**O PAPEL DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B) E DO EIXO IL-12/23-IFN- γ NA
ATIVÇÃO DO SISTEMA NADPH OXIDASE**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

**Área de concentração:
Imunologia**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio
Condino Neto**

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Aragão Filho, Walmir Cutrim.

O papel do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e do eixo IL-12/23- IFN- γ na ativação do sistema NADPH oxidase / Walmir Cutrim Aragão Filho. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Antonio Condino Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Mecanismos imunopatológicos em imunodeficiências primárias e alergia em humanos.

Versão do título para o inglês: The role of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and the IL-12/23-IFN- γ axis in the activation of the NADPH oxidase system.

Descritores: 1. Imunologia 2. Déficit 3. Fator nuclear kappa B 4. Displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência 5. Eixo IL-12/23-IFN- γ 6. NADPH oxidase I. Condino Neto, Antonio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB223/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Walmir Cutrim Aragão Filho.

Título da Dissertação: O papel do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e do eixo IL-12/23- IFN- γ na ativação do sistema NADPH oxidase .

Orientador(a): Antonio Condino Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

“Aos meus pais, à minha irmã e a Deus.”

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador pela confiança, incentivo e compreensão;

À minha família, por todo o amor e apoio que sempre me deram;

À Juliana Moreira pela ajuda na padronização de experimentos, incentivos, amizade e apoio, assim como à sua família pelo apoio constante, ajuda e amizade valiosíssimos;

Ao Josias Brito Frazão e sua família pelo apoio, ajuda e amizade importantíssimos;

À Stefanie Klaver e família pelo apoio, ajuda e amizade;

Ao Marcos L. Blanco, à Jacinta Bustamante, à Carolyn Padden, ao Jean-Laurent Casanova e ao Peter E. Newburger pela colaboração estabelecida;

À Carolina Prando, à Ana Carolina Almeida, ao Edgar Borges de Oliveira Júnior, à técnica Jussara Rehder e ao Paulo V. S. Pereira pela ajuda nas padronizações de experimentos e pela amizade;

Ao Eduardo Formighieri pela ajuda com as análises computacionais realizadas e pela amizade;

À Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP), pela disponibilização de aparelho de “Real-time PCR” para realização de experimentos;

Ao físico Leonardo Varuzza pela revisão das análises estatísticas realizadas por nós;

Aos professores do meu curso de mestrado por todos os ensinamentos passados;

Aos alunos do Laboratório de Alergia e Imunodeficiência em Humanos (USP), Otávio Cabral Marques, Angela Falcai e Patrícia Macchiaverni, e aos alunos do Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células (UNICAMP), Marília, Mateo, Maiara, Bruna e Soraya pela ajuda, amizade e companheirismo;

À técnica Christina Arslanian e à secretária Silvana Lucchini pela ajuda, amizade, e momentos compartilhados;

À Dora Lisa Friedländer Del Nero e ao Paolo R. Errante pelas críticas e sugestões durante a redação desta dissertação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro;

À Elaine, Rosana, Leuridã, Simone e Patrícia Palmeira pela amizade;

Às minhas orientadoras no meu curso de graduação em Ciências Biológicas (UFMA), Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento e Profa. Dra. Márcia Maria Corrêa Rêgo por todos os ensinamentos e pela amizade;

Ao Programa de Educação Tutorial (PET) do meu curso de graduação pelos ensinamentos lá adquiridos;

Aos pacientes e suas famílias que permitiram a realização deste estudo;

Aos amigos queridos!

RESUMO

Aragão-Filho WC. O papel do fator nuclear kappa b (NF- κ B) e do eixo IL-12/23-IFN- γ na ativação do sistema NADPH oxidase [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O sistema NADPH oxidase é um complexo enzimático gerador de superóxido, formado por um flavocitocromo b_{558} , o qual é constituído por duas subunidades protéicas denominadas gp91^{phox} e p22^{phox}, e por outros componentes protéicos citoplasmáticos (p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox}). O fator nuclear κ B (NF- κ B) é um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória, principalmente na resposta linfóide. Contudo, nas células da linhagem mielóide, o papel deste fator de transcrição ainda não foi detalhadamente estudado. A integridade do eixo IL-12/23-IFN- γ também é crítica para a ativação dos fagócitos e controle das infecções. Defeitos na ativação da via do NF- κ B e do eixo IL-12/23-IFN- γ resultam em infecções recorrentes e à susceptibilidade mendeliana a micobacterioses, e podem levar à diminuição da expressão do componente gp91^{phox}. Diante disso, neste trabalho pretendeu-se estudar qual é a relação direta do NF- κ B e de defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ na regulação de genes mielóides, especificamente, com respeito aos genes que codificam componentes do sistema NADPH oxidase humano: p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox} (genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*, respectivamente). Investigou-se a expressão dos componentes do sistema NADPH oxidase em modelos de linhagem mielocítica, células U937, e linfocíticas, células B transformadas por vírus Epstein-Barr provenientes de pacientes com displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID), de pacientes com mutações genéticas de perda de função nos genes codificadores dos componentes do sistema NADPH oxidase (doença granulomatosa crônica), ou de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ . Analisamos o efeito da inibição do NF- κ B sobre a atividade fagocítica em células U937. Por

meio de ferramentas eletrônicas de busca, verificamos a existência de possíveis sítios funcionais de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e/ou p65) aos genes codificadores do sistema NADPH oxidase. Células U937 estavelmente transfectadas com o repressor do NF- κ B (I κ B α S32A/S36A) mostraram expressão significativamente menor dos genes *NCF1* e *NCF2* comparadas a células U937 controle. A expressão do gene *NCF1* em células EDA-ID S32I foi diminuída comparada a células de controles sadios e similar à encontrada em células de pacientes com DGC autossômica recessiva devido a mutação no gene *NCF1*. Também encontramos diminuição da expressão deste gene em linhagens celulares EDA-ID devido à mutação NEMO/IKK γ X420W. A fagocitose de partículas de zimosan não foi afetada pela transfecção com o repressor do NF- κ B em células U937. Ferramentas eletrônicas de busca mostraram a ocorrência de dois sítios específicos para a p50 e seis específicos para a p65 na região intergênica “upstream” ao gene *NCF1* e de um sítio específico para a p50 e dois específicos para a p65 na região intergênica “upstream” ao gene *NCF2*, todos evolutivamente conservados entre os genomas das espécies de *Macaca mulatta*, *Pan troglodytes* e o homem. Células com defeito completo do receptor 1 do IFN- γ (IFNGR1) apresentaram diminuição da expressão do gene *NCF1* tanto basal quanto estimulada por IFN- γ . Dois defeitos completos do receptor 2 do IFN- γ (IFNGR2) distintos impediram o aumento da expressão do gene *NCF1* estimulada por IFN- γ . Os defeitos completo e parcial do IFNGR1 também impediram o aumento significativo da expressão do gene *NCF2* frente ao estímulo com IFN- γ . Estes estudos mostram que o NF- κ B e os receptores IFNGR1 e IFNGR2 são necessários para a expressão dos genes *NCF1* e *NCF2* e para a ativação do sistema NADPH oxidase humano neste sistema modelo.

Palavras-chave: NF- κ B; EDA-ID; Defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ ; NADPH oxidase.

ABSTRACT

Aragão-Filho WC. The role of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and the IL-12/23-IFN- γ axis in the activation of the NADPH oxidase system [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The NADPH oxidase system is an enzymatic complex that generates superoxide. It is composed by a flavocytochrome b_{558} , which is constituted by two protein subunits called gp91-phox and p22-phox, and by other cytoplasmatic protein components (p47-phox, p67-phox and p40-phox). The nuclear factor κ B (NF- κ B) is a transcriptional factor involved in the expression of several genes related to the inflammatory response, mainly in the lymphoid response. However, in the myeloid cell lineage, the role of this transcriptional factor was not detailed established. The appropriate function of the IL-12/23-IFN- γ axis is critical for phagocytes activation and infection control. Defects in the NF- κ B and IL-12/23-IFN- γ axis pathways lead to recurrent infections and to the mendelian susceptibility of mycobacterial disease (MSMD). In addition, they can decrease gp91-phox expression. In this current study we investigated the NF- κ B and the IL-12/23-IFN- γ axis defects consequences on the regulation of myeloid genes, specifically, genes encoding components of the human NADPH oxidase system: p22-phox, p47-phox, p67-phox and p40-phox (*CYBA*, *NCF1*, *NCF2* and *NCF4* genes, respectively). We investigated the expression of NADPH oxidase components in U937 cells, and in B cells transformed by Epstein-Barr virus, from patients with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency (EDA-ID), patients with genetic mutations affecting the NADPH oxidase system (chronic granulomatous disease), or patients with IL-12/23-IFN- γ axis defects. We analyzed the effect of the NF- κ B inhibition on the phagocytic activity of U937 cells and, by means of electronic searching tools, we investigated possible functional binding sites for NF- κ B (p50 and/or p65 subunits) to the encoding genes of the NADPH oxidase system. U937 cells with a stably transfected repressor of NF- κ B

(I κ B α S32A/S36A) demonstrated significantly lower *NCF1* and *NCF2* gene expression compared to control U937 cells. *NCF1* gene expression in EDA-ID S32I cells was decreased compared to normal control cells and similar to autosomal recessive CGD cells due to mutation in *NCF1*. We found a decreased expression of this gene in EDA-ID transformed lineages due to the mutation NEMO/IKK γ X420W. Zymosan phagocytosis was not affected by transfection of U937 cells with the NF- κ B repressor. Electronic searching tools showed the occurrence of two specific sites for p50 and six for p65 in the upstream intergenic region of the *NCF1* gene and one specific site for p50 and two for p65 in the upstream intergenic region of the *NCF2* gene, all evolutionary conserved among the *Macaca mulatta*, *Pan troglodytes* and human genomes. Cells with IFN- γ receptor 1 complete defect (IFNGR1) showed decreased in both basal and IFN- γ -stimulated *NCF1* gene expression. Two distinct IFN- γ receptor 2 complete defects prevent the increase of IFN- γ -stimulated *NCF1* gene expression. Complete and partial IFNGR1 defects also prevent the significant increase of IFN- γ -stimulated *NCF2* gene expression. These studies show that the NF- κ B and the IFNGR1 and INFGR2 receptors are necessary for *NCF1* and *NCF2* gene expression and activation of the human NADPH oxidase in this model system.

Key words: NF- κ B; EDA-ID; IL-12/23-IFN- γ axis defects; NADPH oxidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Ideograma com localização esquemática do gene <i>CYBB</i> no braço curto do cromossomo X, no segmento Xp21.1	25
Figura 02. Região promotora do gene <i>CYBB</i>	25
Figura 03. Ideograma com localização esquemática do gene <i>CYBA</i> no braço longo do cromossomo 16 humano, na região 16q24	26
Figura 04. Ideograma com localização esquemática do gene <i>NCF1</i> no braço longo do cromossomo 7 humano, na região 7q11.23	28
Figura 05. Ideograma com localização esquemática do gene <i>NCF2</i> no braço longo do cromossomo 1 humano, na região 1q25	29
Figura 06. Ideograma com localização esquemática do gene <i>NCF4</i> no braço longo do cromossomo 22 humano, na região 22q13.1	31
Figura 07. Desordens herdadas conhecidas de defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ	41
Figura 08. Representação esquemática da produção de citocinas e cooperação entre monócitos/células dendríticas e células NK/T	43
Figura 09. Expressão dos genes <i>CYBA</i> (A), <i>NCF1</i> (B), <i>NCF2</i> (C) e <i>NCF4</i> (D) em células U937 induzidas (2, 4 e 6) ou não (1, 3 e 5) à diferenciação por IFN- γ e TNF- α	54
Figura 10. Expressão dos genes <i>CYBA</i> (A), <i>NCF1</i> (B) e <i>NCF2</i> (C) em células B EBV transformadas de pacientes com EDA-ID (ocorrência natural de mutações em <i>NEMO</i> ou <i>IKBA</i>) e de pacientes com DGC ligada ao X ou autossômica recessiva	56
Figura 11. Fagocitose de partículas de zimosan por células U937	58
Figura 12. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies <i>M. musculus</i> (camundongo, mm9 chr8:124876452-125083964), <i>M. mulatta</i> (macaco rhesus, rheMac2 chr20:86719209-87003658), <i>P. troglodytes</i> (chimpanzé, panTro2 chr16:88960119-89086524) e o homem (<i>Homo sapiens</i> , hg18 chr16:87217199-87264958), com relação ao gene <i>CYBA</i>	63
Figura 13. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies <i>M. mulatta</i> (macaco rhesus, rheMac2 chr20:86719209-87003658), <i>P. troglodytes</i> (chimpanzé, panTro2 chr16:88960119-89086524) e	

o homem (*H. sapiens*, hg18 chr16:87217199-87264958), com relação ao gene *CYBA* 66

Figura 14. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr3:52035655-52247231), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr7:74367142-74612050) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr7:73806245-73861594), com relação ao gene *NCF1* 68

Figura 15. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr1:154574390-154773297), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr1:187040260-187085280), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr1:163100772-163315576) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr1:181771321-181846339), com relação ao gene *NCF2* 69

Figura 16. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr1:187040260-187085280), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr1:163100772-163315576) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr1:181771321-181846339), com relação ao gene *NCF2* 71

Figura 17. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr15:78059777-78147445), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr10:80737925-80942585), *C. familiaris* (cachorro, canFam2 chr10:30645148-30701038) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr22:35566991-35624004), com relação ao gene *NCF4* 73

Figura 18. Expressão do gene *CYBA* em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ (ocorrência natural de mutações no receptor *IFNGR1* ou *IFNGR2*) e de pacientes com DGC autossômica recessiva 76

Figura 19. Expressão do gene *NCF1* em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ (ocorrência natural de mutações no receptor *IFNGR1* ou *IFNGR2*) e de pacientes com DGC autossômica recessiva 77

Figura 20. Expressão do gene *NCF2* em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ (ocorrência natural de mutações no receptor *IFNGR1* ou *IFNGR2*) e de pacientes com DGC autossômica recessiva 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Nomenclatura atual das doenças causadas por defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ	38
Tabela 02. Etiologia genética dos defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ	42
Tabela 03. Pacientes com defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ avaliados neste estudo	48

LISTA DE QUADROS

- Quadro 01.** Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr8:124876452-125083964), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr20:86719209-87003658), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr16:88960119-89086524) e o homem (*Homo sapiens*, hg18 chr16:87217199-87264958), com relação ao gene *CYBA* 62
- Quadro 02.** Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr20:86719209-87003658), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr16:88960119-89086524) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr16:87217199-87264958), com relação ao gene *CYBA* 64
- Quadro 03.** Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr3:52035655-52247231), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr7:74367142-74612050) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr7:73806245-73861594), com relação ao gene *NCF1* 67
- Quadro 04.** Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr1:154574390-154773297), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr1:187040260-187085280), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr1:163100772-163315576) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr1:181771321-181846339), com relação ao gene *NCF2* 68
- Quadro 05.** Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr1:187040260-187085280), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr1:163100772-163315576) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr1:181771321-181846339), com relação ao gene *NCF2* 70
- Quadro 06.** Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr15:78059777-78147445), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr10:80737925-80942585), *C. familiaris* (cachorro, canFam2 chr10:30645148-30701038) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr22:35566991-35624004), com relação ao gene *NCF4* 72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio em células fagocitárias e o sistema NADPH oxidase</i>	18
1.2 <i>Doença Granulomatosa Crônica</i>	21
1.3 <i>Estrutura molecular e regulação do gene CYBB</i>	22
1.4 <i>Estrutura molecular e regulação do gene CYBA</i>	26
1.5 <i>Estrutura molecular e regulação do gene NCF1</i>	27
1.6 <i>Estrutura molecular e regulação do gene NCF2</i>	28
1.7 <i>Estrutura molecular e regulação do gene NCF4</i>	30
1.8 <i>Fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB)</i>	31
1.9 <i>Displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID)</i>	35
1.10 <i>Defeitos do eixo IL-12/23-IFN-γ</i>	36
2 OBJETIVOS	45
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	45
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 <i>Células e condições de cultura</i>	46
3.2 <i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (real-time PCR)</i>	48
3.3 <i>Fagocitose de partículas de zimosan</i>	49
3.4 <i>Análise computacional sobre possíveis sítios de ligação do NF-κB aos genes codificadores das proteínas do sistema NADPH oxidase (p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox})</i>	50

3.5 <i>Análise estatística</i>	52
4 RESULTADOS	53
4.1 <i>Avaliação da expressão dos genes CYBA, NCF1, NCF2 e NCF4 pelo método de real-time PCR em células U937</i>	53
4.2 <i>Avaliação da expressão dos genes CYBA, NCF1 e NCF2 pelo método de real-time PCR em células B EBV transformadas de pacientes com EDA-ID (ocorrência natural de mutações em NEMO ou IKBA) e de pacientes com DGC ligada ao X ou autossômica recessiva</i>	55
4.3 <i>Fagocitose de partículas de zimosan por células U937</i>	57
4.4 <i>Análise computacional sobre possíveis sítios de ligação do NF-κB, subunidades p50 e p65, aos genes CYBA, NCF1, NCF2 e NCF4 empregando a ferramenta “ECR Browser”</i>	60
4.5 <i>Avaliação da expressão dos genes CYBA, NCF1 e NCF2 pelo método de real-time PCR em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN-γ e de pacientes com DGC autossômica recessiva</i>	74
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio em células fagocitárias e o sistema NADPH oxidase*

O óxido nítrico (NO) é um radical livre inorgânico, gasoso, inodoro, incolor, hidrofóbico e altamente difusível através das membranas plasmáticas (Bryk e Wolff, 1999). Este radical é produzido por meio da clivagem do terminal nitrogênio-guanidina da L-arginina, por meio da enzima óxido nítrico sintase (NOS), numa reação que requer FMN (Flavina mononucleotídeo), FAD (Flavina adenina dinucleotídeo), NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e BH₄ (tetrahydrobiopterina) como cofatores, e a presença do oxigênio molecular que atua como substrato (Nakai, Nakayama e Kato, 1990; Bryk e Wolff, 1999).

O óxido nítrico é capaz de atuar diretamente sobre os microorganismos, provocando efeitos tóxicos e inibitórios sobre diversos processos celulares, como os de crescimento e multiplicação (Anumba, et al., 1999; Bourguignon, Alves e Giovanni-De-Simone, 1997). A produção de óxido nítrico pode ser considerada uma característica típica de macrófagos ativados (Damatta, et al., 2000; Ding e Nathan, 1988; Stuehr e Marletta, 1987).

Os fagócitos, tais como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, possuem ancorado em suas membranas celulares internas um complexo protéico denominado sistema NADPH oxidase através do qual, durante a fagocitose e na dependência do consumo de oxigênio, há a produção de ânion superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio, os quais também são responsáveis pela atividade microbicida, tumoricida, e inflamatória (Henderson e Chappel, 1996; Chanock, et al., 1994). Quando ativado, o sistema NADPH oxidase forma um sistema de elétrons transmembrana que resulta na geração de grandes quantidades de ânion superóxido e de outras espécies reativas do oxigênio essenciais para a função microbicida dos fagócitos, durante o fenômeno da fagocitose.

O conhecimento sobre os componentes do sistema NADPH oxidase, seus genes codificantes e suas relações estruturais, avançou muito nos últimos anos (Royer-Pokora, Kunkel e Monaco, 1986; Volpp, Nauseef e Clark, 1988; Nuno, et al., 1988; Leto, et al., 1990; Dinauer, et al., 1990; Babior, 2004). A NADPH oxidase de fagócitos é constituída por elementos ligados à membranas celulares e por elementos citosólicos. O flavocitocromo b_{558} , o componente ligado à membrana do complexo da NADPH oxidase e que desempenha o papel de doador terminal de elétrons ao oxigênio (Parkos, *et al.*, 1988; Segal e Abo, 1993), é um heterodímero composto por uma subunidade polipeptídica de 22 kDa (chamada de $p22^{phox}$; “- $phox$ ”, refere-se aos termos: oxidase de fagócitos) e uma subunidade glicoprotéica de 91 kDa (chamada de $gp91^{phox}$) (Parkos, *et al.*, 1987; Babior, 2004), estando localizado primariamente na membrana plasmática (Jesaitis, Buescher e Harrison, 1990) e na membrana dos fagossomos (Kjeldsen, *et al.*, 1993). A ativação da NADPH oxidase requer a união do flavocitocromo b_{558} com diversas proteínas citosólicas, incluindo a $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e uma proteína ligante de GTP, a Rac1 em macrófagos ou a Rac2 em neutrófilos (Nauseef, 2004; Diekmann, *et al.*, 1994; Diebold e Bokoch, 2001). Bedard e Krause (2007) e Lambeth, Kawahara e Diebold (2007) revisaram vários aspectos da família da NADPH oxidase, a família NOX. Grandvaux, Faulkner e Fink (2007) revisaram as funções da família Nox e Duox sobre a imunidade inata com respeito à modulação das funções de células dendríticas, reconhecimento de patógenos e potencial papel na resposta à infecções virais.

Além de estar envolvida em doenças que afetam o sistema imunológico, a NADPH oxidase também tem sido relatada como participante dos processos de hipertensão e arteriosclerose, na doença de Alzheimer e em hemorragias cerebrovasculares (Bianca, *et al.* 1999; Bengtsson, *et al.*, 2003; Cathcart, 2004; Walder, *et al.*, 1997; Block, *et al.*, 2007). Ushio-Fukai e Nakamura (2008) revisaram a literatura sobre a NADPH oxidase como um alvo para a terapia contra o câncer.

O sistema NADPH oxidase pode ser induzido por diversas citocinas, particularmente por IFN- γ e TNF- α em monócitos e granulócitos (Cassatella, et al., 1990; Schapiro, et al., 1991).

Evidência de envolvimento do INF- γ na ativação do sistema NADPH oxidase também foi levantada pelo trabalho de Wolfort, Stokes e Granger (2008), estudando um modelo murino de hipercolesterolemia (HC), baseado em camundongos nocautes IFN- γ R^{-/-} e IFN- γ ^{-/-}. Os dados obtidos por estes pesquisadores são consistentes com um mecanismo onde a HC causa aumento da secreção de IFN- γ a partir de células T CD4⁺, resultando no aumento da produção de espécies reativas intermediárias do oxigênio dependente de gp91^{-phox} e disfunção da miografia através de uma via de sinalização independente de STAT-1/IRF-1 que envolve a ativação dos receptores de IFN- γ em células da circulação sanguínea.

Kuwano e colaboradores (2008) verificaram que o TNF- α age como um potente transativador do gene *NOXO1* humano em células T84 (linhagem de células epiteliais do cólon), contribuindo para o aumento da produção de ânion superóxido por estas células, o que sugere um papel potencial da oxidase baseada em Nox-1 (Nox-1, p22^{-phox}, Rac1 e pelo menos dois cofatores adicionais, o organizador Nox 1 (NOXO1) e o ativador Nox 1 (NOXA1) na inflamação do cólon. Outra evidência da atuação do TNF- α sobre oxidases pode ser vista no trabalho de Yen e colaboradores (2008) onde foi observado que o TNF- α aumentou grandemente a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente) e a morte celular por apoptose em modelo murino de infecção endotelial pelo vírus da dengue; o desenvolvimento de hemorragia e sua severidade foram grandemente diminuídos em camundongos nocautes para iNOS ou p47^{-phox}, o que aponta para o papel ativador do TNF- α sobre oxidases e lança a possibilidade de tratamento da infecção pelo vírus da dengue através de inibidores de oxidase.

1.2 Doença Granulomatosa Crônica

A importância do sistema NADPH oxidase como mecanismo microbicida pôde ser evidenciada através do conhecimento da doença granulomatosa crônica (DGC) (Holmes, Page e Good, 1967).

Defeitos moleculares que afetam os componentes do sistema NADPH oxidase levam à DGC, uma imunodeficiência primária caracterizada pela ocorrência precoce de infecções severas recorrentes (Babior, 2004). Nesta doença, os genes *CYBB* e *NCF1* são os mais freqüentemente afetados por mutações (em aproximadamente 60% e 30% dos casos, respectivamente) levando à forma ligada ao X da DGC e a uma forma autossômica desta doença, respectivamente (Heyworth, Cross e Curnutte, 2003; Rae, et al., 1998). Defeitos na *Rac2* podem determinar um quadro semelhante aos sintomas da DGC, combinados com defeitos na quimiotaxia e desgranulação (Ambruso, et al., 2000; Williams, et al., 2000). Pacientes com deficiência em G6PD em eritrócitos e em leucócitos sofrem de uma DGC com sintomas moderados (Baehner, et al., 1972; Gray, et al., 1973; Roos, et al., 1999).

A DGC caracteriza-se clinicamente como uma imunodeficiência grave e rara, com incidência estimada entre 1/200.000 e 1/250.000 nascidos vivos por ano (Winkelstein, et al., 2000). Granulomas decorrentes da atividade inflamatória persistente que ocorre na DGC provocam quadros de obstrução em vísceras ocas, tais como órgãos do trato gastrointestinal e urinário (Bridges, Berendes e Good, 1959; Landing e Shirkey, 1957; Segal, 1988). Infecções em pacientes com DGC são mais comuns nos órgãos em contato com o ambiente externo, tais como os pulmões, trato gastrointestinal e pele, linfonodos que fazem drenagem destas estruturas também podem ser afetados. Outros órgãos e estruturas podem ser afetados, como o fígado, os ossos, rins e cérebro. A formação de granulomas em pacientes com DGC pode ser causada pelo aumento da atividade proinflamatória e apoptose defeituosa de neutrófilos com DGC. A diminuição da produção de mediadores antiinflamatórios por neutrófilos e

macrófagos com DGC durante a fagocitose de bactérias ou de células apoptóticas pode contribuir com a inflamação persistente na DGC (Brown, et al., 2003).

O diagnóstico da DGC tem como base os aspectos clínicos da doença, a comprovação da falha da produção de ânion superóxido e identificação do defeito genético que levou ao desenvolvimento da doença no indivíduo afetado, através de “screening” sobre a ocorrência de mutação nos genes codificadores do complexo da NADPH oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1* ou *NCF2*). A atividade do sistema NADPH oxidase pode ser avaliada através do teste do NBT (nitroblue-tetrazolium), por citometria de fluxo com o uso da DHR (dihidrorodamina) (Ochs e Igo, 1973; Repine, et al., 1978; Repine, Rasmussen e White, 1979; Roesler, et al., 1991; Woodman, et al., 1995), pela quantificação absoluta da liberação de ânion superóxido ou do consumo de oxigênio ou através da análise da produção de peróxido de hidrogênio.

1.3 *Estrutura molecular e regulação do gene CYBB*

O gene *CYBB* humano, por ter sido exaustivamente estudado, tornou-se um modelo interessante para ilustrar a complexidade dos mecanismos moleculares de transcrição linhagem específicos (Skalnik, 2002), e de diferenciação fase específico, por ser ativamente expresso após estágio pró-mielocítico de células mielóides (Royer-Pokora, Kunkel e Monaco, 1986; Leto, et al., 1990).

O componente gp91^{phox} da NADPH oxidase é codificado pelo gene *CYBB* (OMIM 300481), o qual está localizado no braço curto do cromossomo X, no segmento Xp21.1 (Baehner, et al., 1986), ocupa aproximadamente 30kb do DNA genômico e contém 13 exons, os quais variam de 0,7 a 7 Kb em tamanho (Skalnik, Strauss e Orkin, 1991; Skalnik, et al., 1991) (Figura 1). A análise estrutural da região proximal de 1,5 Kb do flanco 5' do gene *CYBB* revelou uma seqüência de pares de bases CCAAT duplicada entre -106 e -124 nt (numeração proximal ao

sítio de início de transcrição), bem como uma região TATA não consensual em -30 nt (Skalnik, Strauss e Orkin, 1991).

Vários trabalhos tentam elucidar os mecanismos de regulação da transcrição do gene *CYBB* (Kautz, et al., 2001). Foram propostos alguns mecanismos repressores e ativadores da região promotora deste gene, a qual possui elementos cis positivos e negativos, onde interagem múltiplos repressores de transcrição, tais como: STAB1, CDP (do Inglês “CCAAT displacement protein”) (Eklund, et al., 2000) e Pbx1 expressos constitutivamente em células indiferenciadas (Eklund, Jalava e Kakar, 2000; Neufeld, et al., 1992). Na diferenciação terminal da célula, é reduzida a expressão das proteínas repressoras e isso permite a ligação de proteínas ativadoras, como é o caso dos fatores Ets, como, por exemplo, a PU.1 e o Elf-1 (Woodman, et al., 1995; Bei, Lu e Eklund, 2005; Skalnik, 2002) à região promotora do gene *CYBB*. Outros elementos cis positivos induzidos pelo IFN- γ também são necessários para a ativação da transcrição do gene *CYBB* (Eklund, Jalava e Kakar, 1998; Eklund e Kakar, 1999), como é o caso do HAF-1 (do Inglês “Hematopoietic-Associated Factor”). Este fator restrito é necessário, mas não suficiente para a indução da transcrição do *CYBB* em células hematopoiéticas estimuladas com IFN- γ (Eklund e Skalnik, 1995). Estudos adicionais demonstraram três elementos entre -450 e -100 nt da região promotora do gene *CYBB* que não compartilham nenhuma seqüência consensual, mas que possuem atividade ligante ao DNA, sendo denominadas BID-1, 2, e 3 (do Inglês “Binding Increased During Differentiation”). Estes BIDs são requeridos na resposta ao IFN- γ . O BID central tem a conformação para um elemento de resposta estimulado por IFN e serve adicionalmente como um sítio de ligação para o fator regulador do IFN (IRF)-1 e -2 (Eklund, Luo e Skalnik, 1996). A administração de IFN- γ em pacientes com DGC devido a defeitos de “splicing” no gene *CYBB* tem se mostrado vantajosa, aumentando a estabilidade de transcritos deste gene em fagócitos destes pacientes (Condino-Neto e Newburger, 2000; Ishibashi, et al., 2001; Errante, Frazão e Condino-Neto, 2008).

A Figura 2 mostra um esboço de alguns elementos transcricionais ativadores e repressores que competem pela ligação à região promotora do gene *CYBB*. Anrather, Racchumi e Iadecola (2006) mostraram que o NF- κ B está envolvido na transcrição do gene codificador do componente gp91^{-phox} da NADPH oxidase em modelo experimental murino.

Em 2005, Thomas e colaboradores relataram a evidência do primeiro mecanismo molecular que um patógeno utiliza para alterar a regulação de genes que contribuem para o “burst” respiratório efetivo. Eles observaram que a infecção de precursores de neutrófilos por *Anaplasma phagocytophilum* (o agente causador da ehrlichiose granulocítica humana) resulta na regulação negativa do gene codificador do componente gp91^{-phox} da NADPH oxidase por um mecanismo de repressão da transcrição deste gene associada com a redução da expressão do fator regulatório 1 do interferon (IRF-1) e da PU.1 nos extratos nucleares das células infectadas por *A. phagocytophilum*. A redução da expressão dos IRF-1 e PU.1 correlacionou-se com o aumento da ligação do repressor CDP ao promotor do gene codificador do componente gp91^{-phox}. Em 2008, Thomas, Samanta e Fikrig também mostraram que a infecção por *A. phagocytophilum* aumenta a ligação de CDP aos promotores das moléculas C/EBPepsilon e peptídeo neutrofilico humano 1, as quais são importantes para a maturação e defesa dos neutrófilos, o que sugere que esta é uma estratégia geral usada por este patógeno para promover a alteração das funções dos leucócitos polimorfonucleares.

Raad e colaboradores (2008) relatam que a fosforilação da gp91^{-phox} em neutrófilos humanos por PKC é um novo mecanismo de regulação da NADPH oxidase, uma vez que promove o aumento da atividade deste complexo enzimático e o agrupamento dos componentes que o formam.

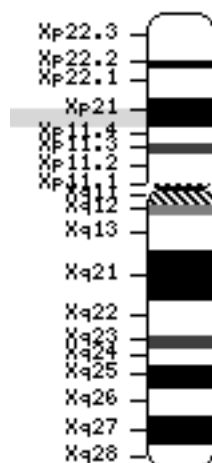


Figura 01. Ideograma com localização esquemática do gene *CYBB* no braço curto do cromossomo X, no segmento Xp21.1.

Fonte: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&CHR=X&maps=genes-r,pheno,morbid,genec&R1=on&query=CYBB&VERBOSE=ON&ZOOM=3>). Acessado em: 28/10/2008. (Adaptado).

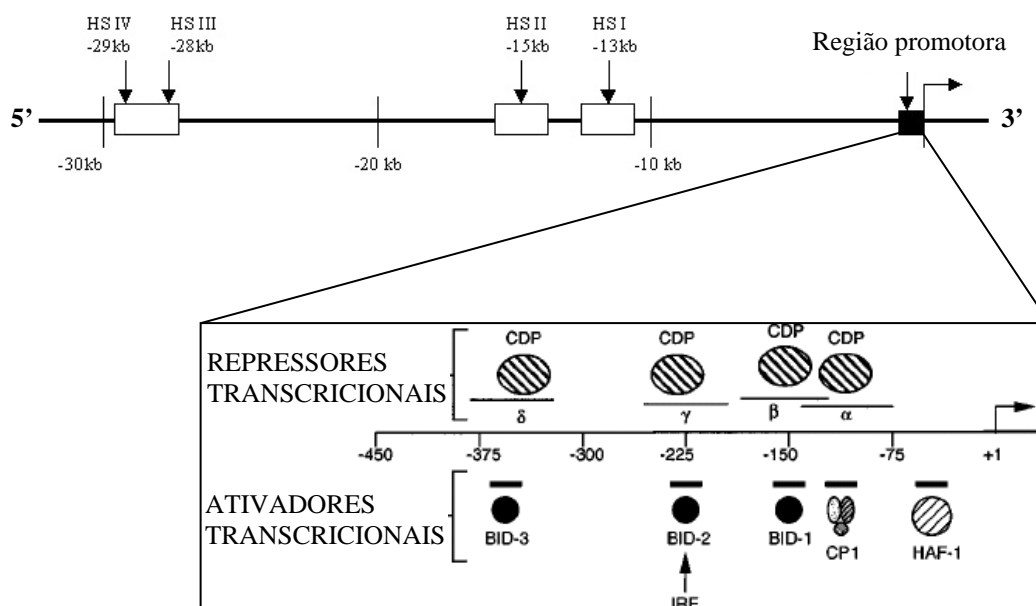


Figura 02. Região promotora do gene *CYBB*. Os repressores transcricionais (CDP) competem com fatores ativadores de transcrição por quatro sítios de ligação dentro da região promotora do gene codificador do componente gp91^{phox} da NADPH oxidase. +1 indica o sítio transcrição inicial. Linhas acima de α , β , γ e δ , indicam posições de cada um dos quatro oligonucleotídeos utilizados como sítios de ligação para CDP. Barras acima dos fatores de ativação transcripcional denotam correspondência à DNase I (adaptado de Luo e Skalnik, 1996).

1.4 Estrutura molecular e regulação do gene *CYBA*

O gene codificador da subunidade p22^{-phox} da NADPH oxidase, o *CYBA* (OMIM 608508), está localizado no braço longo do cromossomo 16 humano, na região 16q24, possui 6 exons (Dinauer, et al., 1990) e muitas variantes alélicas (Dinauer, et al., 1990; Porter, Parkar e Kinnon, 1996; de Boer, et al., 1992; Hossle, et al., 1994) (Figura 3).

Pouco se conhece sobre a regulação do gene *CYBA*. Em 2003, Moreno e colaboradores fizeram uma caracterização preliminar do promotor do gene *CYBA* humano. Eles encontraram regiões consenso para IFN- γ e o NF- κ B, além de identificarem um novo polimorfismo na região promotora desse gene, o qual foi associado com hipertensão em um grupo de 88 pacientes que apresentava importante quadro clínico de hipertensão arterial. A variabilidade genética do *CYBA* foi correlacionada à susceptibilidade à asma brônquica, ou a seus fenótipos relacionados, por Izakovicova, Kaňková e Znojil (2008).



Figura 03. Ideograma com localização esquemática do gene *CYBA* no braço longo do cromossomo 16 humano, na região 16q24.

Fonte: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&CHR=16&maps=genes-r,pheno,morbid,genec&R1=on&query=CYBA&VERBOSE=ON&ZOOM=3>). Acessado em: 28/10/2008. (Adaptado).

1.5 Estrutura molecular e regulação do gene *NCF1*

O gene *NCF1* (OMIM 608512) está localizado no braço longo do cromossomo 7 humano, na região 7q11.23 e codifica a p47^{-phox}, um componente citosólico da NADPH oxidase (Heyworth, Cross e Curnutte, 2003) (Figura 4).

Li e colaboradores (1997) caracterizaram a região promotora do gene *NCF1* e identificaram um sítio funcional de ligação para o fator de transcrição PU.1. Experimentos posteriores confirmaram que a diferenciação dependente do aumento da regulação da transcrição do gene *NCF1* está associada com mudanças na fosforilação e aumento da afinidade de ligação do PU.1 (Marden, et al., 2003). O fator de transcrição C/EBP ϵ foi correlacionado à transcrição de gene *NCF1* em granulócitos/macrófagos em um estudo de camundongos deficientes para este fator (Verbeek, et al., 1999). Berasi e colaboradores (2004) relataram o fator de transcrição HBP1 (do Inglês “HMG box-containing protein 1”) como um fator repressor da expressão do gene *NCF1*. Ni e colaboradores (2007) investigando o papel do fator de transcrição Ets-1 na regulação da geração de ROS induzida por angiotensina II (Ang II), mostraram que a inibição da expressão de Ets-1 por RNA interferência em células primárias de músculo liso aórtico humano inibiu a produção de ROS e a indução da expressão da subunidade p47^{-phox} da NADPH oxidase em resposta à Ang II.

Donaldson e colaboradores (2008) observaram que camundongos p47^{-phox}^{-/-} desenvolvem hiperplasia de linfonodos mesmo sem infecção. Esta hiperplasia foi caracterizada pelo aumento do número de linfócitos T e B nos animais nocautes comparados aos animais selvagens (controle). Também observaram que há fatores microambientais que suprimem a progressão da apoptose destas células “in vivo”, permitindo a acumulação das mesmas nos linfonodos murinos, uma vez que, “in vitro”, estes autores observaram que os linfócitos CD8⁺ p47^{-phox}^{-/-} entram em apoptose mais rapidamente do que os do tipo selvagem. Além disso, a constatação

de que a p47^{phox} é crítica para o aumento da atividade da NADPH oxidase por PMA e TNF- α em células de endotélio microvascular coronariano de camundongos (Li, et al., 2002a), a verificação de que a ausência da p47^{phox} em modelo murino diminuiu a ativação do NF- κ B e a capacidade de defesa do hospedeiro à infecção por *Pseudomonas* sp. (Sadikot, et al., 2004), assim como os achados com relação à DGC (Winkelstein, et al., 2000), fornecem importante suporte para o prosseguimento das investigações sobre os fatores de transcrição que regulam este gene.

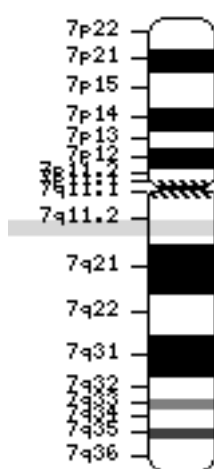


Figura 04. Ideograma com localização esquemática do gene *NCF1* no braço longo do cromossomo 7 humano, na região 7q11.23.

Fonte: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&CHR=7&maps=genes-r,pheno,morbid,genec&R1=on&query=NCF1&VERBOSE=ON&ZOOM=3>). Acessado em: 28/10/2008. (Adaptado).

1.6 Estrutura molecular e regulação do gene *NCF2*

O gene *NCF2* (OMIM 608515), gene codificador da subunidade p67^{phox} da NADPH oxidase, está localizado no braço longo do cromossomo 1 humano, na região 1q25 e possui 16 exons (Figura 5).

O promotor do gene *NCF2* contém três sítios de ligação para PU.1, (Gauss, Bunger e Quinn, 2002; Li, et al., 2001). Gauss e colaboradores (2005) relataram uma nova região responsiva ao TNF- α dentro da região promotora do gene *NCF2*. Ammons e colaboradores (2007) identificaram

um fator transcricional “zinc finger”, o PLAGL2 (do Inglês “Pleomorphic Adenoma Gene-Like 2”), como um importante fator regulatório que se liga à região responsiva ao TNF- α presente no promotor do gene *NCF2*, regulando a expressão gênica do *NCF2*, em resposta ao TNF- α . Li e colaboradores (2001) relataram que a atividade do promotor do gene *NCF2* também requer a participação do fator AP-1. Lindsey e colaboradores (2005) relataram que HOXA10 impede a transcrição do gene *NCF2* em células fagocíticas.

Pagano e colaboradores (1998), através de experimentação em coelhos, verificaram que a angiotensina II estimula a geração de ânion superóxido pela NADPH oxidase em fibroblastos via ativação transcricional do gene codificador do componente p67^{phox} da NADPH oxidase, sugerindo que esta evidência de regulação dos componentes da NADPH oxidase poderia prover uma nova maneira de tratamento da hipertensão arterial dependente da produção de ânion superóxido.

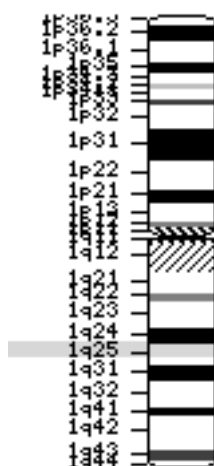


Figura 05. Ideograma com localização esquemática do gene *NCF2* no braço longo do cromossomo 1 humano, na região 1q25.

Fonte: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&CHR=1&maps=genes-r,pheno,morbid,genec&R1=on&query=NCF2&VERBOSE=ON&ZOOM=3>). Acessado em: 28/10/2008. (Adaptado).

1.7 Estrutura molecular e regulação do gene NCF4

O gene *NCF4* (do Inglês “Neutrophil Cytosolic Factor 4”) (OMIM 601488), gene codificador da subunidade p40^{phox} da NADPH oxidase, está localizado no braço longo do cromossomo 22 humano, na região 22q13.1 e possui 10 exons (Figura 6).

A p40^{phox} foi a última subunidade do sistema NADPH oxidase a ser descoberta (Matute, et al., 2005) e seu papel neste sistema continua sendo pouco definido. Foi descrita como uma proteína de 40 kDa, a qual foi co-purificada em um complexo de 250 kDa com a subunidade p67^{phox} e p47^{phox}, por Wientjes e colaboradores (1993). É predominantemente expressa em neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, megacariócitos, células B e T (Wientjes, et al., 1993; Zhan, et al., 1996; Tsunawaki e Yoshikawa, 2000). Durante a ativação celular, a p47^{phox} associa-se com o complexo p67^{phox} e a p40^{phox}, e estas três subunidades translocam-se para a membrana (Wientjes, et al., 1993), mas não está claro se a p40^{phox} permanece ligada à p67^{phox}/p47^{phox} (Tsunawaki, et al., 1994; Tsunawaki, et al., 1996), ou se é dissociada do complexo ativado da NADPH oxidase (Tsunawaki e Yoshikawa, 2000; Someya, et al., 1996).

Embora nenhum paciente com DGC tenha sido identificado com defeitos na p40^{phox} e esta não seja requerida para a atividade da NADPH oxidase, tanto em modelos experimentais “cell-free”, quanto em modelos experimentais celulares, a p40^{phox} pode estar envolvida na modulação da atividade da NADPH oxidase devido à sua forte associação com a p67^{phox}, de acordo com as evidências que demonstram uma regulação positiva e/ou negativa da NADPH oxidase pela p40^{phox} (Matute, et al., 2005). Em sua revisão, Matute e colaboradores (2005) concluem que, apesar de ser dispensável para a atividade da NADPH oxidase “in vitro”, a p40^{phox} participa da atividade da NADPH oxidase “in vivo”, embora seu papel exato continue controverso.

Ellson e colaboradores (2006), através do estudo de neutrófilos de camundongos nocautes para a p40^{phox}, observaram que este defeito levou

à redução da produção de ROS por estes neutrófilos, em resposta a *Staphylococcus aureus*, o que é semelhante ao encontrado na morte deste microorganismo “in vitro” e “in vivo”, quando em quadro de ocorrência de DGC. Estes autores concluem que a p40^{phox} seria um componente essencial na morte de bactérias.

Li e colaboradores (2002b), relataram que a PU.1 é requerida para a transcrição gênica de p40^{phox} em células mielóides, e Tamura e colaboradores (2007) utilizando-se de sistema “cell-free”, relataram que a subunidade p40^{phox} pode substituir a subunidade p47^{phox} na ativação do sistema NADPH oxidase, interagindo com as subunidades p22^{phox} e p67^{phox} deste sistema, através de suas regiões específicas.

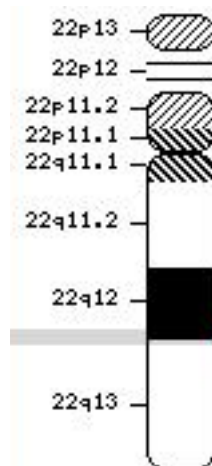


Figura 06. Ideograma com localização esquemática do gene *NCF4* no braço longo do cromossomo 22 humano, na região 22q13.1.

Fonte: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&CHR=22&maps=genes-r,pheno,morbid,genec&R1=on&query=NCF4&VERBOSE=ON&ZOOM=3>). Acessado em: 28/10/2008. (Adaptado).

1.8 Fator de transcrição nuclear kappa B (*NF-κB*)

O fator de transcrição nuclear kappa B (*NF-κB*) foi descrito por Sen e Baltimore em 1986 como uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B. Atualmente, sabe-se que este fator também está envolvido na transcrição de diversos genes ligados à resposta inflamatória, genes envolvidos na apoptose e na transformação neoplásica

celular (Skalnik, 2002), possuindo implicações, por exemplo, na doença inflamatória intestinal (IBD – “Inflammatory Bowel Disease”) (Atreya, Atreya e Neurath, 2008).

O NF- κ B é um heterodímero formado por membros da família de genes Rel presentes em mamíferos, a qual inclui as subunidades p105/p50, p100/p52, p65 (RelA), RelB, e c-Rel (Hoffmann, Natoli e Ghosh, 2006; Ghosh, May e Kopp, 1998). O NF- κ B é composto por duas subunidades, e seu protótipo clássico é constituído por uma proteína de 50 kDa, chamada de p50 ou NF- κ B1 e uma outra de 65 kDa chamada de p65 ou RelA (Baeuerle e Henkel, 1994). Em outros tipos celulares não leucocitários ou células de outros organismos, como as de insetos, estes dímeros podem ocorrer de outras formas promovendo diversas combinações heterodiméricas (p50/p52, p50/p105, p100/p529) e, provavelmente, combinações homodiméricas em células de mamíferos (p50/p50) (Fujita, et al., 1992; Moore, Rosen e Ruben, 1993).

Logo após a identificação do NF- κ B, em 1988, Baeuerle e Baltimore identificaram uma proteína (de tamanho de 60 a 70 kDa) com atividade inibitória ao NF- κ B, chamada de I κ B, que se associa especificamente a dímeros do NF- κ B, formando trímeros (p50/p65/I κ B, por exemplo), impedindo que o NF- κ B se ligue ao DNA quando dentro do núcleo celular. Além disso, a forma trimérica resultante da união de uma I κ B ao NF- κ B, obriga a retenção deste complexo trimérico no citoplasma celular (Rice, Mackichan e Israel, 1992; Verma, et al., 1995; Baldwin, 1996). Foram descritas várias proteínas inibitórias englobando a família das I κ Bs (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ) e o proto-oncogene Bcl-3, entre outras (Haskill, et al., 1991; Inoue, et al., 1992). As proteínas nucleares I κ B (Bcl-3, I κ B ζ e I κ BNS), assim denominadas por se encontrarem no compartimento nuclear das células, bem como em seu citoplasma, foram revisadas quando à sua função “in vivo” no contexto das respostas imunes do hospedeiro e doenças (Yamamoto, et al., 2008).

No mecanismo geral de ativação do complexo clássico e mais comum do NF- κ B (p50/RelA) por sinais extracelulares, há a indução da

fosforilação da I κ B, que se encontra formando o trímero p50/RelA/I κ B, por I κ Bs quinases específicas (IKK α e IKK β , em conjunto com proteínas regulatórias, IKK γ /NEMO) em resíduos críticos de serina, Ser32 e Ser36, dentro do domínio de sinal de resposta N-terminal (Brown, et al., 1995; Pennington, et al., 2001; Häcker e Karin, 2006). A fosforilação da I κ B leva a sua rápida ubiquitinação e rápida degradação proteolítica por proteassomos, liberando, desta forma, o heterodímero do NF- κ B, o qual pode se mover para o interior do núcleo celular (Traenckner, Wilk e Baeuerle, 1994; Krappmann, Wulczyn e Scheidereit, 1996; Didonato, et al., 1997; Mercurio, et al., 1997; Verma e Setevenson, 1997). Além da fosforilação da porção I κ B para a liberação do heterodímero do NF- κ B, também ocorre a fosforilação deste último como um mecanismo indireto de ativação. Alguns autores relatam que a fosforilação da serina 276 da subunidade p65 aumenta dramaticamente a atividade transcricional promovida pelo NF- κ B (Zhong, et al., 1997; Tak e Firestein, 2001). No núcleo, o NF- κ B interage com elementos responsivos cis e trans localizados nas regiões promotoras de diversos genes, ligando-se a motivos de reconhecimento decaméricos que seguem a seqüência de base consenso GGGRHTYYCC (R = purina, Y= pirimidina, e H = não G) (Ghosh, May e Kopp, 1998), de forma a modular a transcrição de genes envolvidos em uma miríade de funções, incluindo genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas induzíveis, regulando tanto as respostas imunes inatas quanto adaptativas (Smith, et al., 1996; Merika, et al., 1998; Shimizu, et al., 1997; Siebenlist, Brown e Claudio, 2005; Moynagh, 2005). Dentre os genes, cuja expressão é controlada pelo NF- κ B, os mais conhecidos são os genes codificadores do fator de crescimento GM-CSF; das moléculas de adesão celular MAd-CAM-1, ELAM-1, ICAM-1, VCAM; das citocinas IL-1, 2, 6, 8, TNF- α , INF- α e β ; de fatores anti-apoptóticos, TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1, c-IAP2, dentre outros (Stein e Yang, 1995; Baldwin, 1996; Gerritsen, et al., 1997; Wang, et al., 1998; McKay e Cidlowski, 1999).

Dentre a variedade de estímulos extracelulares que podem ativar o NF- κ B, podem ser destacados: citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1, fatores ativadores de linfócitos T e B, LPS bacteriano, proteínas virais, fatores de crescimento e fatores indutores de estresse (Brown, et al., 1995; Carlsen, et al., 2002). Brown e colaboradores (1997) mostraram que o IFN- γ aumentou significativamente a atividade do NF- κ B e alterou o peso molecular aparente de proteínas semelhantes ao NF- κ B1 em macrófagos murinos estimulados por LPS ou IL-2. Através de ensaios de mobilidade eletroforética (EMSA), estes autores observaram que NF- κ B1/p50 foi um componente de todos os complexos analisados, enquanto que RelA/p65 esteve presente nas células estimuladas por IFN- γ /LPS.

A inibição da ativação do NF- κ B pode ser realizada por uma variedade de ferramentas farmacológicas, tais como as drogas anti-inflamatórias não esteroidais, os hormônios esteróides anti-inflamatórios, e toxinas (D'acquisti, May e Ghosh, 2002). Brennan, Donev e Hewamana (2008) revisaram a literatura dos diferentes inibidores do NF- κ B no contexto do tratamento de câncer, dividindo-os em quatro categorias diferentes: anti-oxidantes que já foram descritos como inibidores da ativação do NF- κ B, inibidores de proteassomo e proteases, inibidores da fosforilação e/ou degradação da I κ B α e inibidores mistos do NF- κ B.

Ghosh e Hayden (2008) revisaram a literatura sobre os reguladores da atividade do NF- κ B e destacaram a importância do desenvolvimento de tratamentos específicos de inibição deste fator, em detrimento de sua inibição generalizada, uma vez que diversos artigos recentes sugerem o desenvolvimento de consequências negativas severas devido à inibição geral do NF- κ B, como o prejuízo à resolução da inflamação.

Ouaaz, Li e Beg (1999), estudando fibroblastos de camundongos deficientes em p65, relataram que esta subunidade do NF- κ B e os sinais induzidos por ela e pelo IFN- γ são necessários para a ativação máxima de genes envolvidos na respostas imunes adquiridas, tais como MHC de classe I, CD40, e o receptor Fas.

Anrather, Racchumi e Iadecola identificaram dois supostos sítios de ligação do NF- κ B na região promotora do gene codificador da gp91^{-phox} em modelo experimental murino e demonstraram a supressão da expressão deste gene pela I κ B α em células de linhagens monocíticas e microgliais murinas (Anrather, Racchumi e Iadecola, 2006). Gauss e colaboradores (2007) propuseram que a ativação TNF- α dependente do NF- κ B aumenta a regulação da atividade da NADPH oxidase fagocítica humana, levando ao aumento da produção de ânion superóxido; aumentando a expressão dos genes *CYBB*, *NCF1* e *NCF2*; e à posterior ativação do NF- κ B, o que, potencialmente, contribui para a produção sustentada de oxidantes na inflamação crônica.

1.9 Displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID)

A EDA-ID foi caracterizada em um pequeno número de pacientes do sexo masculino que sofrem com infecções severas por bactérias piogênicas (*Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*) e deficiências específicas de anticorpos polissacarídicos (Abinun, 1995; Abinun, et al., 1996). Várias mutações hipomórficas no NEMO (do Inglês “NF- κ B essencial modulador”) foram encontradas como causa de condições distintas nos acometidos pela EDA-ID (Para atualização sobre mutações que acometem o *NEMO*, consultar Fusco e colaboradores (2008)). Pacientes com EDA-ID sofrem de infecções bacterianas recorrentes e severas que afetam o trato respiratório inferior, a pele, tecidos moles, ossos e o trato gastrointestinal, bem como de meningites e septicemias na infância. Os agentes causadores das doenças são bactérias Gram-positivas, freqüentemente (*S. pneumoniae* e *S. aureus*), seguidas por bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas* spp. e *Haemophilus influenzae*) e micobactérias. Pacientes com displasia ectodérmica anidrótica podem apresentar como características clínicas: hipo ou anodontia com incisivos cônicos, pele seca com hipo ou anidrose e hipo ou atricose.

A maioria dos pacientes possui hipogamaglobulinemia com baixos níveis de IgG sérica, os níveis das outras classes de imunoglobulina (IgA, IgM e IgE) variam. Alguns pacientes com EDA-ID possuem elevados níveis de IgM (um fenótipo de hiper-IgM) (Döffinger, et al., 2001; Jain, et al., 2001; Zonana, et al., 2000). Células B de alguns pacientes têm sua habilidade de troca de classe de imunoglobulinas reduzida em resposta ao CD40 ligante, em outros casos, o troca de classe é normal, mas há um decréscimo na proliferação e ativação das células B, o que resulta num fenótipo de hiper-IgM. A diminuição da atividade de células NK foi identificada em alguns (Orange, et al., 2002), mas não em todos (Döffinger, et al., 2001; Dupuis-Girod, et al., 2002) os pacientes com EDA-ID. As anormalidades imunológicas que os pacientes EDA-ID apresentam podem estar relacionadas ao tipo de mutação do NEMO envolvida em cada caso de EDA-ID.

As características imunológicas e infecciosas dos pacientes resultam de uma resposta celular diminuída dos linfócitos do sangue periférico ao LPS, IL-1 β , IL-18, TNF- α e ao CD40L (Döffinger, et al., 2001). Vias dependentes do NF- κ B também podem estar afetadas nestes pacientes, como a via de ativação dos receptores do tipo “Toll” (TLR) dependentes da ativação do NF- κ B por meio do NEMO (O’neill e Dinarello, 2000).

EDA-ID é uma imunodeficiência severa com significativa morbidade e mortalidade. Infecções recorrentes causam sérias complicações, tais como bronquiectasias, doença pulmonar crônica e diarreia intratável.

1.10 Defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ

Anteriormente denominado por Susceptibilidade Mendeliana à Doenças Micobacterianas (referida em Inglês pela sigla MSMD, MIM 209950 (Hamosh, et al., 2005)), o conjunto de doenças originadas a partir da ocorrência de defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ passou a ser referido de acordo com o componente do eixo afetado, conforme mostrado na Tabela

1, adaptado de Geha, et al. (2007). Esta tabela também mostra as células e funções afetadas.

O eixo IL-12/23-IFN- γ é central para a resposta imune a patógenos intracelulares, tais como micobactérias. Os defeitos do eixo dão origem a uma rara síndrome congênita que foi provavelmente descrita pela primeira vez em 1951 em uma criança com doença disseminada causada pela vacina de bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Mimouni, 1951). É definida por doença clínica severa causada por espécies de micobactérias fracamente virulentas, tais como vacinas de BCG e micobactérias não tuberculínicas (Levin, et al., 1995; Casanova, et al., 1995; Casanova, et al., 1996; Dorman e Holland, 2000; Casanova e Abel, 2002). Nesta síndrome, também há doenças causadas por espécies tifoídais e não-tifoídais de *Salmonella* (Dorman e Holland, 2000; Casanova Abel, 2002; MacLennan, et al., 2004).

Os pacientes apresentam resposta defeituosa da função de monócitos estimulados com endotoxina e IFN- γ (Levin, et al., 1995), além de prejuízo sobre a apresentação de antígenos (D'Souza, et al., 1996).

Tabela 01. Nomenclatura atual das doenças causadas por defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ .

Doença	Células afetadas	Função afetada	Características associadas	Herança	Defeitos genéticos/Patogênese presumida
Deficiência da cadeia $\beta 1$ do receptor de IL-12 e IL-23	L + NK	Secreção de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AR	Cadeia $\beta 1$ do receptor de IL-12 e IL-23
Deficiência de IL-12p40	M	Secreção de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AR	Subunidade IL-12p40 de produção de IL-12/IL-23: IL-12/IL-23
Deficiência do receptor 1 do IFN- γ	M + L	Ligação e sinalização de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AR, AD	Cadeia de ligação sinalização IFN- γ R1: IFN- γ R
Deficiência do receptor 2 do IFN- γ	M + L	Sinalização de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AR	Cadeia de sinalização IFN- γ R2: IFN- γ R
Deficiência de STAT1 (2 formas)	M + L	Sinalização de IFN γ $\alpha/\beta/\gamma$	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> , <i>Salmonella</i> e viroses	AR	STAT1
		Sinalização de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AD	STAT1

AD – herança autossômica dominante; AR – herança autossômica recessiva; M – monócitos-macrófagos; L – linfócitos; NK – “natural killer cells”.
 Fonte: Adaptado de Filipe-Santos, et al., 2006b.

Filipe-Santos e colaboradores (2006b) também relataram uma forma ligada ao X de doença causada por defeito no eixo IL-12/23-IFN- γ , devido a mutações específicas no gene *NEMO*.

A IL-23 é formada pelas subunidades p19/p40, e a IL-12 é composta pelas subunidades p35/p40. Estas duas citocinas ligam-se ao receptor de IL-12 β 1 (IL-12R β 1), localizado na superfície de células T e “natural killer” (NK), por meio de suas subunidades p40 (Ozenci, et al., 2001). As subunidades p35 (IL-12) e p19 (IL-23) ligam-se aos receptores IL-12R β 2 e IL-23R, respectivamente (Parham, 2002). O receptor IL-12R β 2 é o componente intracelular de sinalização para o complexo do receptor IL-12R (IL-12R β 1/IL-12R β 2) (Presky, et al., 1996). A ligação de IL-12 ao complexo heterodimérico do receptor de IL-12 induz a fosforilação da tirosina quinase 2 (Tyk2) e da Janu quinase 2 (JAK2) e a subsequente ativação de STAT4, o qual dimeriza-se e transloca-se para o núcleo procedendo à ativação de genes induzíveis pela IL-12.

O receptor do IFN- γ constitui-se de duas subunidades: o IFN- γ R1 (IFNGR1), o qual se constitui na cadeia de ligação para o IFN- γ , e o IFN- γ R2, a cadeia de transdução de sinal (Bach, et al., 1997). A interação de homodímeros de IFN- γ com a cadeia de ligação promove a dimerização desta cadeia, a qual fica então associada a duas cadeias de transdução de sinal, o que leva à ativação das quinases JAK1 e JAK2, as quais fosforilam resíduos chaves de tirosina nas cadeias de ligação. Isso leva ao recrutamento e ativação de STAT1, o qual transloca-se para o núcleo celular como um homodímero fosforilado (GAF), promovendo a ativação de genes responsivos ao IFN- γ .

Rosenzweig e Holland (2005) revisaram a literatura sobre defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ no controle de infecções micobacterianas. Mutações nos receptores IFNGR1 e IFNGR2 estão associadas a infecções micobacterianas, sendo as mutações no IFNGR1 (60 pacientes) mais prevalentes do que as mutações no IFNGR2 (4 pacientes). Os patógenos mais freqüentes em pacientes com mutações no IFNGR1 são as micobactérias ambientais e o bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Já foram isoladas várias espécies de micobactérias em pacientes com esta síndrome, tais como: *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium*

abscessus, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*. *Mycobacterium smegmatis* (Pierre-Audigier, et al., 1997) e *Mycobacterium peregrinum* (Koscielniak, et al., 2003).

Defeitos nos genes *IL12B*, *IL12RB1* e *NEMO* são associados à produção prejudicada de IL-12/IL-23 dependente de IFN- γ , enquanto que defeitos nos genes *IFNGR1*, *IFNGR2* e *STAT1* são associados a respostas celulares prejudicadas frente ao estímulo do IFN- γ (Filipe-Santos, et al., 2006b). Mutações causais já foram identificadas em mais de 220 pacientes (Filipe-Santos, et al., 2006b). A deficiência de IL-12R β 1 é a etiologia mais comum (aproximadamente 40% dos casos), seguida pela deficiência de do IFN- γ R1 (aproximadamente 39% dos casos), deficiência de IL-12p40 (aproximadamente 9% dos casos), deficiência de Stat-1 (5% dos casos), deficiência de IFN- γ R2 (4% dos casos) e deficiência de NEMO em apenas 3% dos casos (Figura 7 e Tabela 2). A Figura 8 mostra um resumo esquemático dos componentes do eixo IL-12/23-IFN- γ que apresentam defeitos nesta síndrome.

A importância das IL-12 e IL-23 sobre doenças autoimunes tem sido levantada por diversos trabalhos (Ozenci, et al., 2001; Yen, et al., 2006; Kikly, et al., 2006). Butchar e colaboradores (2008), estudando monócitos primados com IFN- γ durante infecção por *Francisella* sp., mostraram evidências da existência de uma amplificação entre IL-23 e IFN- γ em células NK e linfócitos T, que levaria à produção de IL-12.

Guia e colaboradores (2008) apresentaram dados sobre o papel das IL-12 e IL-23 na maturação de células NK e linfócitos T humanos “in vivo”, o que pode explicar a susceptibilidade que pacientes com defeitos no eixo IL-12/23 possuem frente a infecções por micobactérias e salmonelas.

De Boer e colaboradores (2008) mostraram que a vacinação por vacina de vírus influenza sazonal em pacientes com deficiência completa do receptor IL-12R β 1 ou com deficiência parcial do receptor IFNGR1 induziu a produção de IFN- γ por células T, de forma independente de IL-12/23. Segundo estes autores, as quantidades de IFN- γ produzidas pela vacinação podem resultar em proteção humoral suficiente para pacientes

com deficiência do receptor IL-12R β 1 e do receptor IFNGR1. Held e colaboradores (2008) observaram que o desenvolvimento de respostas imunes protetoras por células T devido à infecção do sistema nervoso central de murinos por coronavírus é independente da sinalização feita pelo eixo IL-12/23.

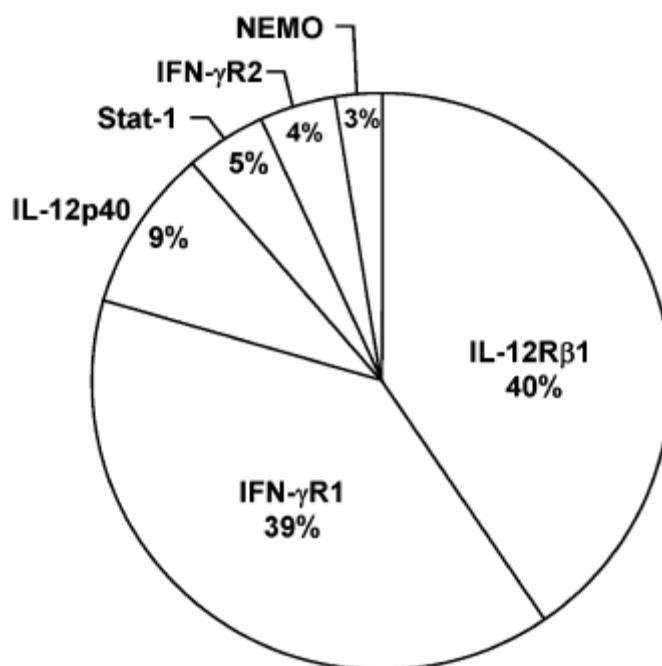


Figura 07. Desordens herdadas conhecidas de defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ . Defeitos genéticos de 220 pacientes com defeito no eixo IL-12/23-IFN- γ , 150 publicados e 70 não publicados. A porcentagem de defeitos nos genes autossômicos (IFNGR1, IFNGR2, STAT1, IL12B, IL12RB1) e ligado ao X (NEMO) está indicada.

Fonte: Adaptado de Filipe-Santos, et al., 2006b.

Tabela 02. Etiologia genética dos defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ .

Gene	Herança	Defeito	Proteína	Referências
IFN-γR1	AR	C	E+	Jouanguy, et al., 2000
	AR	C	E-	Newport, et al., 1996; Jouanguy, et al., 1996
	AD	P	E+	Jouanguy, et al., 1999
	AR	P	E+	Jouanguy, et al., 1997
IFN-γR2	AR	C	E+	Vogt, et al., 2005
	AR	C	E-	Dorman e Holland, 1998
	AR	P	E+	Döffinger, et al., 2000
Stat-1	AD	P	E+P-	Dupuis, et al., 2001
	AD	P	E+B-	Chapgier, et al., 2006
IL-12B	AR	C	E-	Picard, et al., 2002; Altare, et al., 1998a
IL-12Rβ1	AR	C	E+	Fieschi, et al., 2004
	AR	C	E-	Altare, et al., 1998b; de Jong, et al., 1998; Fieschi, et al., 2003
NEMO	XR	P	E+	Filipe-Santos, et al., 2006a

AD - herança autossômica dominante; AR - herança autossômica recessiva; XR - herança recessiva ligada ao X; C - defeito completo; P - defeito parcial; proteína mutante expressa (E+), não expressa (E-), não fosforilada (P-), ou com falha na ligação ao DNA (B-) sob estímulo de IFN- γ .

Fonte: Adaptado de Filipe-Santos, et al., 2006b.

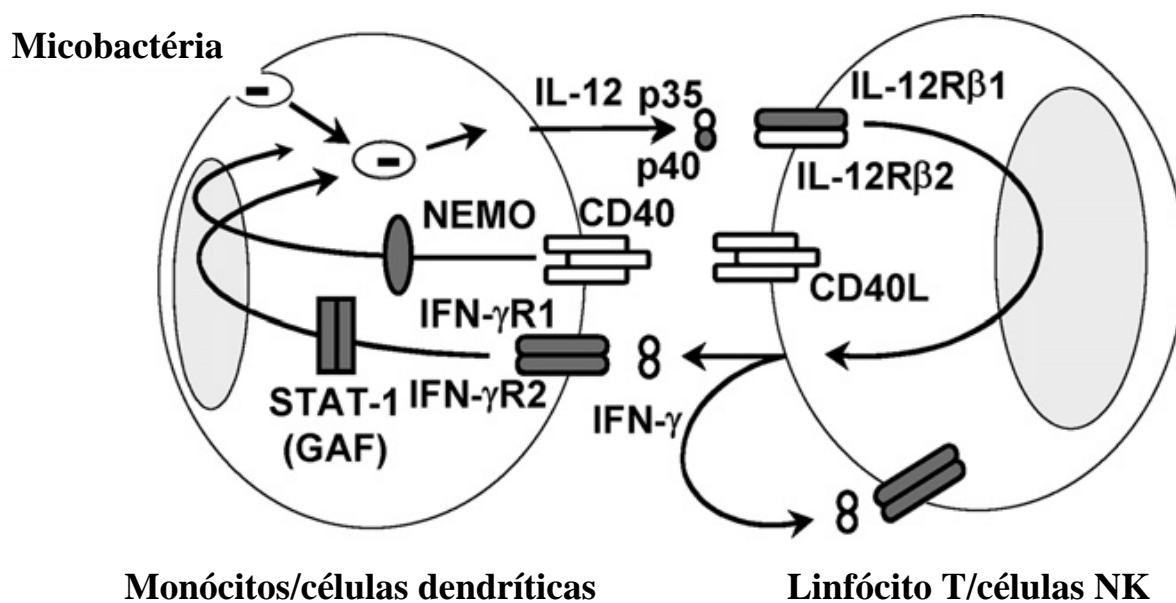


Figura 08. Representação esquemática da produção de citocinas e cooperação entre monócitos/células dendríticas e células NK/T. A interação IL-12/23-IFN- γ e a ativação da via CD40/CD40L correspondente à cooperação entre células T e monócitos/células dendríticas monocyte/dendritic cells é crucial para a imunidade protetora a infecções por micobactérias em humanos. A produção de IL-12 está sob controle tanto da sinalização por IFN- γ quanto pela sinalização CD40-NEMO. Moléculas mutantes em pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ estão identificadas em cinza. A IL-23 e seu receptor não estão representados, mas podem estar envolvidos na imunidade protetora contra micobactéria e/ou salmonella. Fonte: Adaptado de Filipe-Santos, et al., 2006b.

Neste trabalho, investigamos a hipótese de que o NF- κ B poderia ser um elemento chave sobre a expressão dos componentes p22^{-phox}, p47^{-phox}, p67^{-phox} e p40^{-phox} do sistema NADPH oxidase, e tentamos correlacionar este possível papel do NF- κ B com a doença granulomatosa crônica (DGC) e a displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID).

A existência de evidências na literatura científica sobre a influência do INF- γ na ativação do sistema NADPH oxidase (Wolfort, Stokes e Granger, 2008), inclusive o seu uso como tratamento em DGC causada por defeitos de “splicing” no gene *CYBB* (Condino-Neto e Newburger, 2000; Ishibashi, et al., 2001; Errante, Frazão e Condino-Neto, 2008) e da influência de defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ sobre a expressão do gene *CYBB* (Prando, 2008), motivou-nos a investigar a hipótese de que defeitos

no eixo IL-12/23-IFN- γ , especificamente, defeitos nos receptores IFNGR1 e IFNGR2, poderiam influenciar o sistema NADPH oxidase a partir da expressão dos seus componentes p22^{-phox}, p47^{-phox} e p67^{-phox}.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Investigar o papel do NF- κ B e de defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ sobre a expressão dos genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*, respectivamente codificadores dos componentes p22-phox, p47-phox, p67-phox e p40-phox do sistema NADPH oxidase.

2.2 *Objetivos Específicos*

1) Avaliar a expressão dos genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4* em células U937 e em células B imortalizadas pelo vírus Epstein-Barr (células B EBV imortalizadas ou transformadas) de pacientes com DGC, EDA-ID ou com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ ;

2) Caso haja influência do NF- κ B sobre a expressão dos genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e/ou *NCF4*, investigar a existência de possíveis sítios de ligação para as subunidades p50 e/ou p65 do NF- κ B em região “upstream” e intergênica aos respectivos genes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Células e condições de cultura

A linhagem de células humanas U937 derivadas de um linfoma histiocístico difuso foi obtida da *American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)*. Células U937 transfectadas com um vetor vazio pCMV3 ou com um vetor pCMV3 contendo um constructo *FLAG-tagged* de uma I κ B α com mutações das serinas 32 e 36 a alanina foram gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos V. Paya (Asin, et al., 1999). A mutação I κ B S32A/S36A impede a fosforilação da I κ B, levando ao seqüestro do NF- κ B no citoplasma.

As células U937 foram cultivadas ($0,5-1 \times 10^6$ células/mL) em meio RPMI 1640 completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por aquecimento, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, e 100 μ g/mL de estreptomicina à 37 °C em atmosfera úmida (5% de CO₂). Com o objetivo de induzir diferenciação celular, células U937 tipos selvagem ou mutante foram cultivadas com IFN- γ (100 U/mL) e TNF- α (1000 U/mL) por 48 horas.

Células B imortalizadas pelo vírus Epstein Barr (células B EBV transformadas) preparadas a partir de células mononucleares de sangue periférico expressam o flavocitocromo *b₅₅₈* encontrado em fagócitos e possuem atividade da NADPH oxidase (Condino-Neto e Newburger, 1998; Volkman, et al., 1984). As linhagens celulares obtidas de pacientes reproduzem acuradamente os defeitos bioquímicos e moleculares presentes na doença granulomatosa crônica (DGC) (Condino-Neto e Newburger, 1998; Dusi, et al., 1998). Células B imortalizadas por EBV foram preparadas de acordo com procedimentos previamente publicados (Condino-Neto e Newburger, 1998), a partir de doadores saudáveis, pacientes com DGC ligada ao X ou autossômica recessiva, de dois pacientes com displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID) e de pacientes previamente identificados como possuidores de

defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ , conforme mostrado na Tabela 3. As linhagens celulares B EBV transformadas provenientes de pacientes com DGC e EDA-ID foram gentilmente cedidas pelo professor Jean-Laurent Casanova (Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U550, Paris, France). O paciente com DGC ligada ao X tem uma mutação no gene *CYBB* caracterizada previamente como uma substituição A>G na posição -2 no sítio de *splice* do intron 9, levando à deleção do exon 10, perda da expressão da gp91^{-phox} e a um decréscimo no *burst* respiratório. Os pacientes com DGC autossômica recessiva em nosso estudo apresentaram as seguintes mutações gênicas: *CYBA*, deleção dos éxons 2-5; *NCF1*, deleção gt no início do exon 2, comum à maioria destes casos (Chanock, et al., 1991); e *NCF2*, mutação no sítio de *splice* no exon 4.

Linhagens de células B EBV transformadas foram obtidas de pacientes previamente descritos com EDA-ID e infecções recorrentes graves. Um paciente tem EDA-ID ligada ao X causada por uma mutação hipomórfica hemizigótica no gene codificador do NEMO/IKK γ (X420W), a subunidade regulatória do complexo I κ B quinase (IKK) (Döffinger, et al., 2001), levando ao decréscimo da ativação do NF- κ B nas células deste paciente (Dupuis-Girod, et al., 2002; Dupuis-Girod, et al., 2006). O segundo paciente tem uma forma autossômica dominante de EDA-ID associada com uma mutação hipermórfica heterozigótica (S32I) na serina 32 da I κ B α (Courtois, et al., 2003). Esta mutação de ganho de função aumenta a capacidade inibitória da I κ B α pela prevenção de sua fosforilação e degradação, resultando na diminuição da ativação do NF- κ B (Courtois, et al., 2003).

Todos os reagentes utilizados foram “endotoxin-free” (menor do que 10 pg/mL pelo ensaio *Limulus ameobocyte lysate*).

Tabela 03. Pacientes com defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ avaliados neste estudo.

Paciente	Gene, tipo de defeito, herança	Mutação
IFNGR2-c (a)	<i>IFNGR2</i> ; defeito completo; AR	T168N/T168N
IFNGR2-c (b)	<i>IFNGR2</i> ; defeito completo; AR	278delAG/278delAG
IFNGR2-pd	<i>IFNGR2</i> ; defeito parcial; AR	R114C/R114C
IFNGR1-c	<i>IFNGR1</i> ; defeito completo; AR	453delT/453delT
IFNGR1-pr	<i>IFNGR1</i> ; defeito parcial; AR	I87T/I87T
IFNGR1-pd	<i>IFNGR1</i> ; defeito parcial; AD	818del4/WT

AR – herança autossômica recessiva; AD – herança autossômica dominante.

Para testes de ativação das linhagens de células B EBV transformadas dos pacientes com defeito no eixo IL-12/23-IFN- γ , linfócitos B-EBV de 6 controles normais e 8 pacientes com defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ (Tabela 3) foram ativados com IFN- γ na proporção de 10^3 UI em 500 μ L de RPMI para cada $2,5 \times 10^6$ células durante 15 minutos, à 37 °C.

3.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time PCR*)

RNA total foi isolado de células U937 ou células B EBV transformadas (10^7 células) por Trizol (TRIzol[®] Reagent (INVITROGEN15596-026) ou Trizol GIBCO-BRL, Gaithersburgh, Md., USA), de acordo com as instruções do fabricante. Transcrições reversas de 3 μ g do RNA total foram feitas utilizando-se SuperScript II RT e hexâmeros randômicos. Os cDNAs foram amplificados por real-time PCR usando SYBR Green Real Time System (Applied Biosystems). Cada 25 μ L de mix de PCR continham 12 ng/ μ L de cDNA, 8 μ L de SYBR[®] Green Master Mix (1X SYBR[®] Green Buffer, 3 mM MgCl₂, 200 nM mix de dNTP, 0,63 U Amplitaq Gold[®], 0,25 U AmpErase[®]), e os seguintes primers específicos: p47-^{phox} (GenBank NM_000256) *forward* primer (5'-CCT CTT TCC AGT GCA TTT AAG G-3'), *reverse* primer 5'-GAT GTG ACG GAT GAA GGT GTC-3'; p67-^{phox} (GenBank NM_000433) *forward* primer 5'-CGG ACA AGA AGG ACT GGA AG -3', *reverse* primer 5'-GGA AGT AAG CCA CTG CCA AG-3', p22-^{phox} (GenBank NM_000101) *forward* primer 5'-ATG TGG GCC AAC GAA CAG-3', *reverse* primer 5'-GTA CTC CAG CAG GCA CAC AA-3', p40-

^{phox} (GenBank NM_000631) *forward* primer 5'-GGC CGA GAG TGA CTT TGA AC-3', *reverse* primer 5'-TCA CCT CGA TGA CGA AAA CA-3', β actin (GenBank NM_001101) *forward* primer 5'- TCA CCG AGC GCG GCT-3', *reverse* primer 5'-TAA TGT CAC GCA CGA TTT CCC-3'. As condições de ciclo de temperatura para o aparelho ABI 7500 thermal cycler foram: para p22-^{phox}, p47-^{phox}, p67-^{phox} e p40-^{phox}: 50 °C por 2 min., 95 °C por 10 min. e então 40 ciclos de 95 °C por 15 seg. e 60 °C por 1 min. Depois de 40 ciclos, uma curva de dissociação (*melting curve*) foi gerada no intervalo de 60 °C a 95 °C. A amplificação paralela de β actina (Gene Bank NM 001101) foi usada para normalizar a quantidade de amostra. As reações foram feitas em triplicata e os resultados representam a média \pm S.D. Curvas padrões para cada produto de amplificação foram geradas a partir de diluições de 10 vezes de *pools* de cDNAs para a determinação da eficiência dos primers.

3.3 Fagocitose de partículas de zimosan

Células U937 (2×10^6 células/mL) foram tratadas ou não com IFN- γ (100 U/mL) por 48 horas antes da incubação com partículas de zimosan (2×10^7 partículas/mL) à 37 °C por 2 horas. As partículas de zimosan foram opsonizadas ou não com 10% de soro humano fresco por 30 min. à 37 °C antes dos ensaios de fagocitose. O número de células que fagocitaram partículas de zimosan foi determinado pela contagem de células contendo duas ou mais partículas de zimosan em pelo menos cinco campos da lâmina contendo as células (mínimo de 200 células) ao microscópio óptico comum. Os resultados representam a porcentagem do número total de células que fagocitaram partículas de zimosan sob os parâmetros descritos acima.

3.4 Análise computacional sobre possíveis sítios de ligação do NF- κ B aos genes codificadores das proteínas do sistema NADPH oxidase (*p22^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}* e *p40^{phox}*)

Buscando identificar possíveis sítios de ligação do NF- κ B aos genes *CYBA* (região genômica: chr16:87237199-87244958, leia-se cromossomo 16 da região genômica 87237199 até 87244958), *NCF1* (região genômica: chr7:73826245-73841594), *NCF2* (região genômica: chr1:181791321-181826339) e *NCF4* (região genômica: chr22:35586991-35604004), antes de testes de bancada, utilizamos a ferramenta “ECR Browser” (ECR do Inglês: “Evolutionary Conserved Elements”), localizada no site: <http://ecrbrowser.dcode.org/>. Esta ferramenta permite-nos fazer comparações entre o genoma humano e diversos outros genomas de espécies evolutivamente mais ou menos distantes à espécie humana. Através destas comparações podemos identificar sítios genômicos conservados durante a evolução, sobre os quais podemos inferir a existência de funcionalidade biológica (Ovcharenko, et al., 2004; Ovcharenko, Stubbs e Loots, 2004; Ovcharenko, et al., 2005). Além disso, dentro da ferramenta “ECR Browser” há ferramentas de procura de sítios de ligação de fatores de transcrição, tais como a ferramenta “Mulan” (do Inglês: “**MU**ltiple sequence Local **Alig**Nment and conservation visualization tool”) (Ovcharenko, et al., 2005), “rVISTA 2.0” (Gabriela, Loots e Ovcharenko, 2004) e a “TRANSFAC professional V10.2”. Assim, utilizando seqüências genômicas conservadas entre o genoma humano e o de outras espécies como base para a procura de possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição, podemos eliminar grande parte da ocorrência de falsos positivos sobre os possíveis sítios de ligação do NF- κ B aos nossos genes de interesse. Procuramos por sítios de ligação conservados para as subunidades p50 e p65 do NF- κ B em regiões exônicas, intrônicas e flanqueadoras (20000 Kb “upstream” e “downstream” em relação ao gene de interesse) de cada um dos genes em análise. Intervalos de regiões genômicas pesquisados *CYBA*: chr16:87217199-87264958, *NCF1*:

chr7:73806245-73861594, *NCF2*: chr1:181771321-181846339 e *NCF4*: chr22:35566991-35624004.

Procuramos por elementos conservados evolutivamente compartilhados com pelo menos 6 espécies diferentes de vertebrados: *Mus musculus* (camundongo, espécie representada pela notação “mm9” dentro do sistema do “ECR Browser”), *Macaca mulatta* (macaco rhesus, espécie representada pela notação “rheMac2” dentro do sistema do “ECR Browser”), *Pan troglodytes* (chimpanzê, espécie representada pela notação “panTro2” dentro do sistema do “ECR Browser”) e *Canis familiaris* (cachorro, espécie representada pela notação “canFam2” dentro do sistema do “ECR Browser”) (usada apenas na análise feita para o gene *NCF4*) evolutivamente mais próximas ao genoma humano e as espécies de peixe *Danio rerio* (peixe-zebra, espécie representada pela notação “danRer5” dentro do sistema do “ECR Browser”) e *Fugu rubripes* (uma espécie de baiacu, espécie representada pela notação “fr2” dentro do sistema do “ECR Browser”), evolutivamente mais distantes. Para tornar a nossa busca mais apurada, utilizamos os seguintes parâmetros: no programa “ECR Browser”, existência de pelo menos 85% de similaridade entre as seqüências gênicas consideradas conservadas; no programa “TRANSFAC professional V10.2”, o índice de similaridade de matriz de pelo menos 0.85 para as regiões de sítios de ligação com as subunidades do NF- κ B analisadas. A inclusão de espécies evolutivamente mais distantes, no nosso caso de estudo, os peixes, é positiva, pois a grande distância evolutiva entre os peixes e o homem fornece um filtro adicional com o qual elementos funcionais não codificantes, tais como locais de ligação de fatores de transcrição, podem ser detectados com grande eficiência (Ovcharenko, Stubbs e Loots, 2004; Venkatesh, Gilligan e Brenner, 2000; Aparício, et al., 2002; Nóbrega, et al., 2003; Santagati, et al., 2003; Spitz, Gonzalez e Duboule, 2003).

Para detalhes sobre a utilização da ferramenta “ECR Browser” e “Mulan”

(<http://ecrbrowser.dcode.org/ecrInstructions/ecrInstructions.html>;
<http://mulan.dcode.org/mulanInstructions.php>; respectivamente).

3.5 *Análise estatística*

Os resultados foram mostrados em Box-plots: percentis 25 e 75, mínimo e máximo, e mediana; ou em barras \pm S.E.M. As comparações entre os grupos foram estabelecidas pelos testes Mann Whitney mono-caudal ou ANOVA mono-caudal, seguido pelo teste t de Tukey; valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão dos genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4* pelo método de real-time PCR em células U937

Como mostrado nas partes B e C da Figura 9, respectivamente, há inibição da expressão gênica de *NCF1* e *NCF2* no subclone de células U937 transfectadas com o inibidor I κ B S32A/S36A, comparada a células U937 selvagens ou a células transfectadas com vetor vazio. As Figuras 9A e 9D mostram que a expressão dos genes *CYBA* e *NCF4*, respectivamente, não foi afetada pela transfecção de células U937 com vetor vazio ou com I κ B S32A/S36A (* $p < 0,05$; $n = 5$; Mann Whitney mono-caudal).

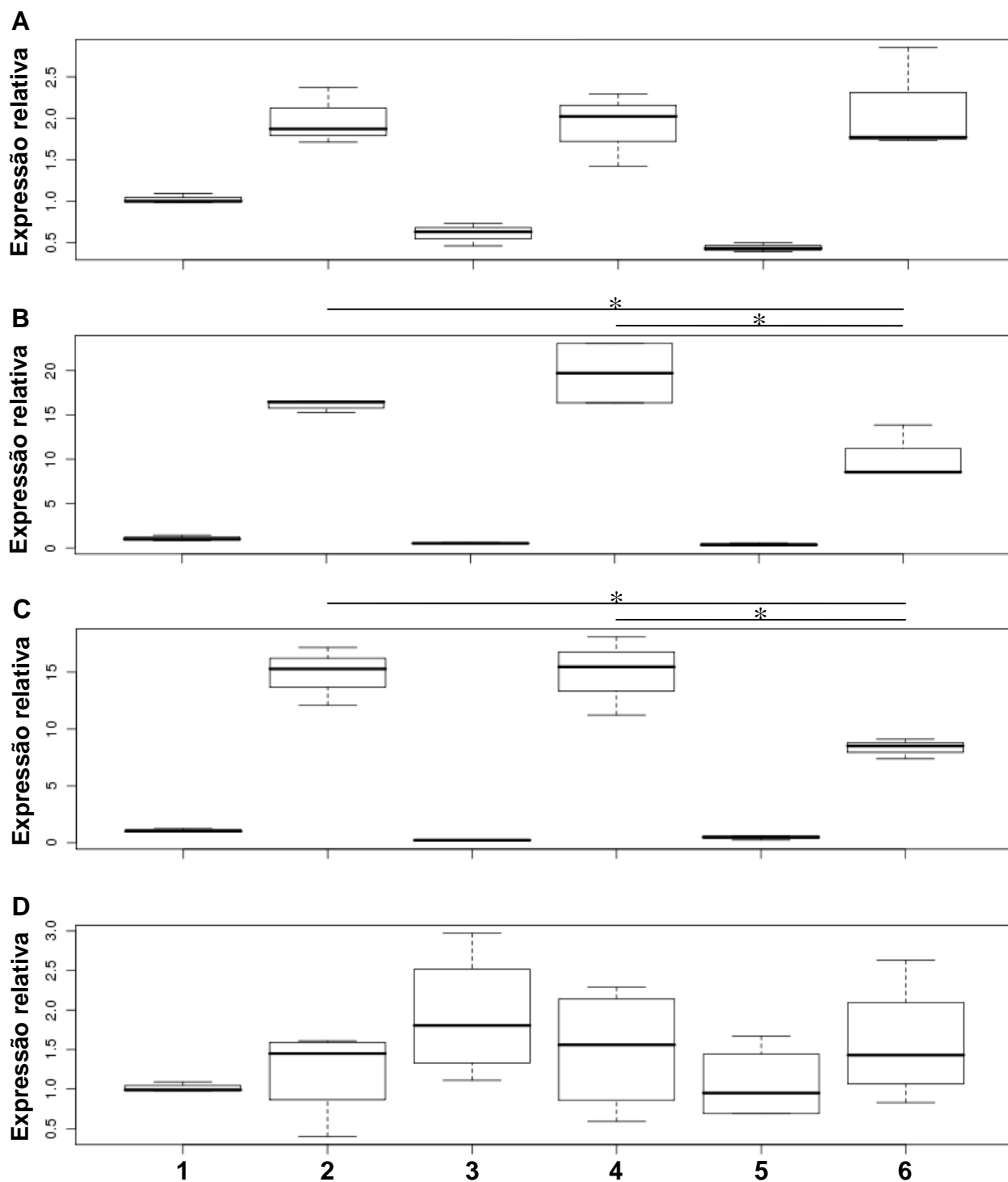


Figura 09. Expressão dos genes *CYBA* (A), *NCF1* (B), *NCF2* (C) e *NCF4* (D) em células U937 induzidas (2, 4 e 6) ou não (1, 3 e 5) à diferenciação por IFN- γ e TNF- α . U937 = 1 e 2, U937 pCMV3 = 3 e 4, U937 I κ B S32A/S36A = 5 e 6 (* $p < 0,05$; $n = 5$; Mann Whitney mono-caudal).

4.2 Avaliação da expressão dos genes *CYBA*, *NCF1* e *NCF2* pelo método de real-time PCR em células B EBV transformadas de pacientes com EDA-ID (ocorrência natural de mutações em *NEMO* ou *IKBA*) e de pacientes com DGC ligada ao X ou autossômica recessiva

Para testar a hipótese de que efeitos supressores similares ao sistema NADPH oxidase observados nas células U937 poderiam ser encontrados em situações de ocorrência natural de mutações em *NEMO* ou *IKBA*, nós examinamos os níveis de transcrição dos genes *CYBA*, *NCF1* e *NCF2* em células B EBV transformadas de pacientes com EDA-ID, em comparação a linhagens celulares de doadores saudáveis e de pacientes com DGC ligada ao X ou autossômica recessiva.

A Figura 10 mostra a expressão dos genes *CYBA*, *NCF1* e *NCF2* em linhagens de células B EBV transformadas de pacientes com EDA-ID comparada à de controles saudáveis e de pacientes com DGC ligada ao X ou com DGC autossômica recessiva devido a defeitos nos componentes p22^{-phox}, p47^{-phox} ou p67^{-phox}. A Figura 10A mostra que a expressão de *CYBA* foi afetada apenas na linhagem celular de paciente com DGC devido a defeitos no componente p22^{-phox} (*p<0,05; n = 5; Mann Whitney mono-caudal) e que houve um aumento na expressão deste gene na linhagem celular de paciente com DGC ligada ao X. A Figura 10B mostra que a expressão do gene *NCF1* nas linhagens celulares de EDA-ID devido à mutação IκB S32I foi significativamente menor do que na linhagem celular de doadores saudáveis ou nas linhagens celulares de pacientes com DGC (*p<0,05; n = 5; Mann Whitney mono-caudal) e que esta foi equivalente à encontrada em linhagem celular de paciente com DGC devido a defeitos no componente p47^{-phox}; além disso, a expressão do *NCF1* nas linhagens celulares EDA-ID devido à mutação *NEMO/IKKγ* X420W também foi significativamente inferior à encontrada na linhagem celular de doadores saudáveis. A Figura 10C mostra que a expressão de *NCF2* foi afetada somente de forma parcial na linhagem celular EDA-ID devido à mutação IκB S32I (*p<0,05; n = 5; Mann Whitney mono-caudal), mas que foi quase

abolida na linhagem celular DGC deficiente em p67^{-phox} (* $p < 0,05$; $n = 5$; Mann Whitney mono-caudal). A Figura 10C também mostra que a expressão de *NCF2* foi aumentada na linhagem celular EDA-ID devido à mutação NEMO/IKK γ X420W.

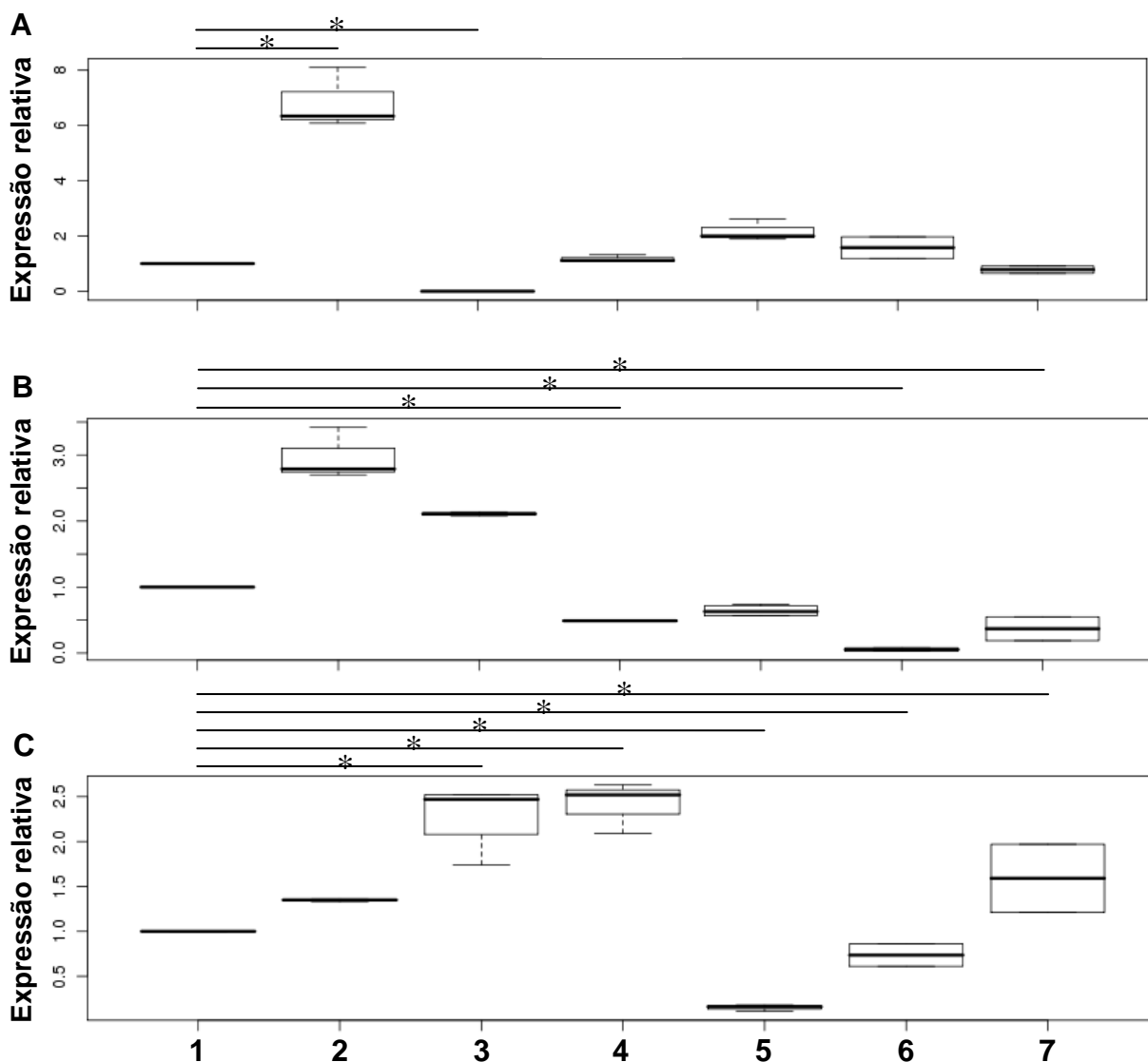


Figura 10. Expressão dos genes *CYBA* (A), *NCF1* (B) e *NCF2* (C) em células B EBV transformadas de pacientes com EDA-ID (ocorrência natural de mutações em NEMO ou IKBA) e de pacientes com DGC ligada ao X ou autossômica recessiva. As linhagens de células B foram derivadas de: 1, doadores saudáveis; 2, paciente com DGC ligada ao X; 3, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *CYBA* (A22-CGD); 4, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *NCF1* (A47-CGD); 5, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *NCF2* (A67-CGD); 6, paciente com EDA-ID devido à mutação I κ B S32I; 7, paciente com EDA-ID devido à mutação NEMO/IKK γ X420W (* $p < 0,05$; $n = 5$; Mann Whitney mono-caudal).

4.3 Fagocitose de partículas de zimosan por células U937

Para testar se a inibição da funcionalidade da via do NF- κ B (ou o processo de transfecção) causou um decréscimo geral de outras funções celulares, nós examinamos a habilidade de células U937 em ingerir partículas de zimosan. Células U937 selvagens e células transfectadas com o vetor vazio ou com o inibidor I κ B S32A/S36A do NF- κ B mostraram atividades fagocíticas similares (Figura 11). A opsonização do zimosan com soro humano fresco causou um aumento significativo na atividade fagocítica das células U937 com manutenção da função normal nas células transfectadas com vetor cheio ou vazio (Figura 11). O tratamento das células U937 com IFN- γ (100 U/mL) por 48 horas resultou em decréscimo aproximado de 20% da atividade fagocítica quando comparado às células U937 que não receberam este estímulo, isso foi comum às três linhagens de células U937 analisadas (U937, U937 pCMV3 e U937 I κ B S32A/S36A).

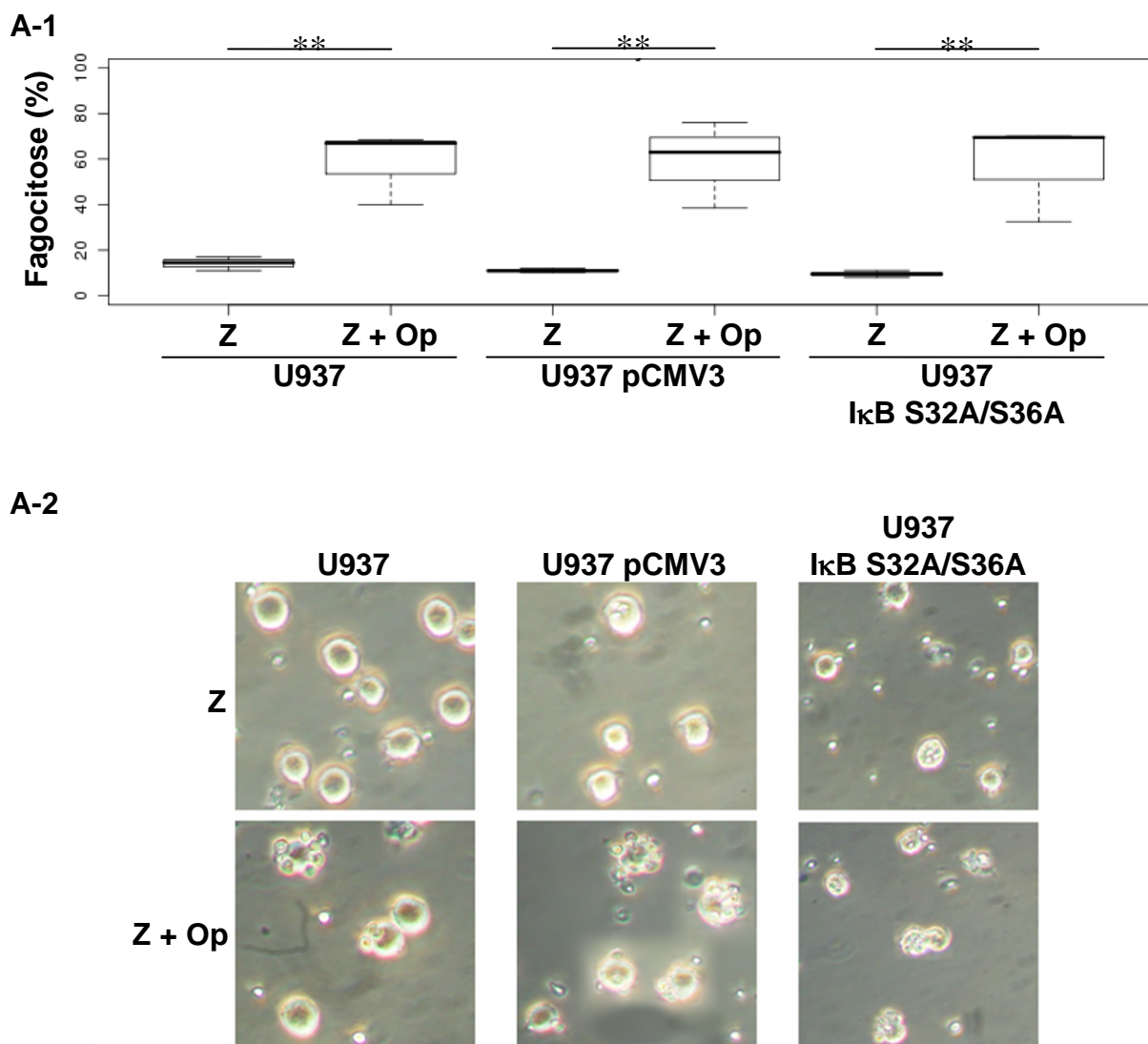


Figura 11. Fagocitose de partículas de zimosan por células U937. A e B, células U937 pCMV3 e U937 IκB S32A/S36A mostram níveis similares de fagocitose de partículas de zimosan (Z) opsonizadas (Op) ou não com soro humano fresco comparadas a células do tipo selvagem (U937). Em **B**, vemos que o tratamento das células U937 com IFN- γ (100 U/mL) por 48 horas resultou em decréscimo aproximado de 20% da atividade fagocítica quando comparado às células U937 que não receberam este estímulo, isso foi comum às três linhagens de células U937 analisadas (U937, U937 pCMV3 e U937 IκB S32A/S36A). Em **A-2** e **B-2** são mostradas fotos amostrais da atividade fagocítica das linhagens U937 analisadas, conforme os experimentos empreendidos (aumento de 200 X ao microscópio óptico comum; ** $p < 0,01$; $n = 3$; Mann Whitney mono-caudal) (Continua).

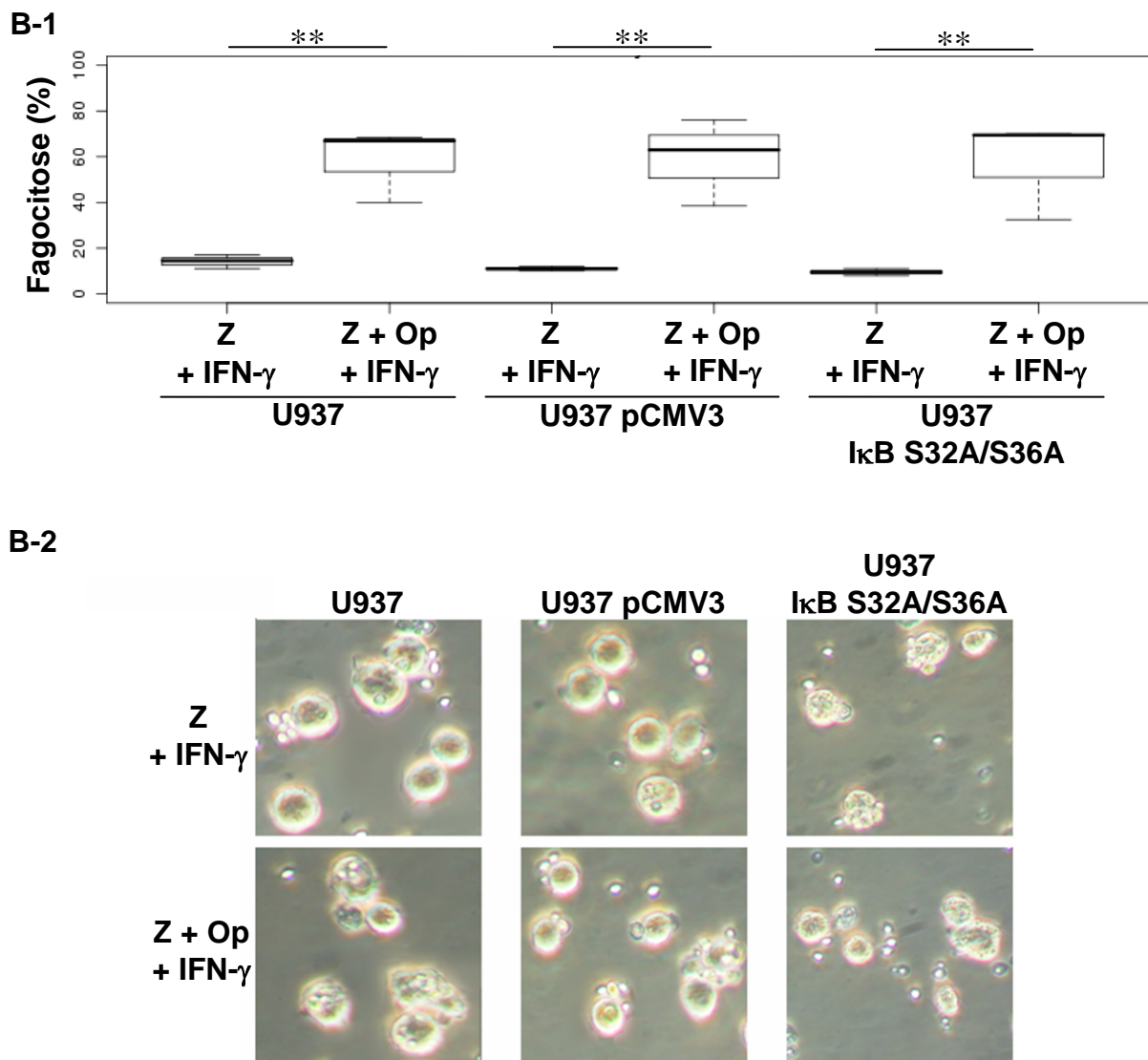


Figura 11. Fagocitose de partículas de zimosan por células U937. A e B, células U937 pCMV3 e U937 I κ B S32A/S36A mostram níveis similares de fagocitose de partículas de zimosan (Z) opsonizadas (Op) ou não com soro humano fresco comparadas a células do tipo selvagem (U937). Em **B**, vemos que o tratamento das células U937 com IFN- γ (100 U/mL) por 48 horas resultou em decréscimo aproximado de 20% da atividade fagocítica quando comparado às células U937 que não receberam este estímulo, isso foi comum às três linhagens de células U937 analisadas (U937, U937 pCMV3 e U937 I κ B S32A/S36A). Em **A-2** e **B-2** são mostradas fotos amostrais da atividade fagocítica das linhagens U937 analisadas, conforme os experimentos empreendidos (aumento de 200 X ao microscópio óptico comum; ** $p < 0,01$; $n = 3$; Mann Whitney mono-caudal) (Conclusão).

4.4 Análise computacional sobre possíveis sítios de ligação do NF- κ B, subunidades p50 e p65, aos genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4* empregando a ferramenta “ECR Browser”

Através da análise computacional empregada para identificar possíveis sítios de ligação do NF- κ B, subunidades p50 e p65, aos genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4* encontramos, para o gene:

- a) *CYBA*: 2 possíveis sítios de ligação conservados entre o genoma humano e o genoma do camundongo, 49 entre o genoma humano e o do macaco rhesus e 95 entre o genoma humano e o do chimpanzé, não foram encontrados possíveis sítios de ligação entre o genoma humano e o das espécies de peixes estudadas. Encontramos 2 possíveis sítios de ligação conservados entre os genomas do camundongo, do macaco rhesus, do chimpanzé e o do homem (Quadro 1 e Figura 12) e 38 possíveis sítios de ligação conservados entre os genomas do macaco rhesus, do chimpanzé e o do homem, dos quais 2 são específicos para a p50 e encontram-se “upstream” ao gene *CYBA* e em região intergênica (Quadro 2 e Figura 13);
- b) *NCF1*: 23 possíveis sítios de ligação conservados entre o genoma humano e o do macaco rhesus e 51 entre o genoma humano e o do chimpanzé, não foram encontrados possíveis sítios de ligação entre o genoma humano e o do camundongo, bem como com respeito às espécies de peixes estudadas. Não encontramos possíveis sítios de ligação conservados entre os genomas do camundongo, do macaco rhesus, do chimpanzé e o do homem, mas encontramos 23 possíveis sítios de ligação conservados entre os genomas do macaco rhesus, do chimpanzé e o do homem, dos quais 2 são específicos para a p50 e 6 para a p65 e encontram-se “upstream” ao gene *NCF1* e em região intergênica (Quadro 3 e Figura 14);
- c) *NCF2*: 7 possíveis sítios de ligação conservados entre o genoma

humano e o genoma do camundongo, 17 entre o genoma humano e o do macaco rhesus e 46 entre o genoma humano e o do chimpanzé, não foram encontrados possíveis sítios de ligação entre o genoma humano e o das espécies de peixes estudadas. Encontramos 1 possível sítio de ligação conservado entre os genomas do camundongo, do macaco rhesus, do chimpanzé e o do homem (Quadro 4 e Figura 15) e 17 possíveis sítios de ligação conservados entre os genomas do macaco rhesus, do chimpanzé e o do homem, dos quais 1 é específico para a p50 e 2 para a p65 e encontram-se “upstream” ao gene *NCF2* e em região intergênica (Quadro 5 e Figura 16);

- d) *NCF4*: 7 possíveis sítios de ligação conservados entre o genoma humano e o genoma do camundongo, 11 entre o genoma humano e o do cachorro e 46 entre o genoma humano e o do macaco rhesus, não foram encontrados sítios entre o genoma humano e o da espécie de peixe Fugu (*F. rubripes*) analisada. Encontramos 7 possíveis sítios de ligação conservados entre os genomas do camundongo, do macaco rhesus, do cachorro e o do humano, dos quais 1 é específico para a p65 e encontra-se “upstream” ao gene *NCF4* e em região intergênica (Quadro 6 e Figura 17).

Quadro 01. Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr8:124876452-125083964), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr20:86719209-87003658), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr16:88960119-89086524) e o homem (*Homo sapiens*, hg18 chr16:87217199-87264958), com relação ao gene *CYBA*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>).

1 V\$NFKAPPAB65_01 + 15224-15233 cGGAATTTCC + 69194-69203 tGGATTTTCC + 75055-75064 cGGAATTTCC + 75918-75927 cGGAATTTCC
2 V\$NFKAPPAB_01 - 15225-15234 GGAATTTCCC - 69195-69204 GGATTTTCCC - 75056-75065 GGAATTTCCC - 75919-75928 GGAATTTCCC

Legenda: exemplo: 1⁽¹⁾ V\$NFKAPPAB_01⁽²⁾ -⁽³⁾ 21932-21941⁽⁴⁾ GGGAAGTCCT⁽⁵⁾ +⁽³⁾ 76449-76458⁽⁴⁾ AGGACTTCCC⁽⁵⁾ -⁽³⁾ 30327-30336⁽⁴⁾ GGGAAGTCCT⁽⁵⁾ -⁽³⁾ 33030-33039⁽⁴⁾ GGGAAGTCCT⁽⁵⁾. No exemplo, **(1)** = número identificador da região onde se encontra o possível sítio de ligação das subunidades do NF- κ B estudadas; **(2)** = identificação da subunidade ligante do NF- κ B que se ligaria ao sítio identificado, “V\$NFKAPPAB50” para um possível sítio de ligação da subunidade p50 do NF- κ B, “V\$NFKAPPAB65” para um possível sítio de ligação da subunidade p65 do NF- κ B e “V\$NFKAPPAB” para um possível sítio de ligação tanto para a subunidade p50 quanto para a p65 do NF- κ B; **(3)** = determinação da localização do possível sítio de ligação das subunidades do NF- κ B estudadas, com respeito se na fita positiva (+) ou se na fita (-) do DNA genômico; **(4)** = posição do possível sítio de ligação para as subunidades do NF- κ B estudadas dentro das regiões analisadas em cada genoma verificado; **(5)** = seqüência de bases nitrogenadas que identificam a seqüência de nucleotídeos que formam os possíveis sítios de ligação das subunidades do NF- κ B estudadas. As primeiras, segundas, terceiras e quartas seqüências de **(3)**, **(4)** e **(5)** correspondem a dados de localização e de seqüência de nucleotídeos dos possíveis sítios de ligação dentro do genoma do homem, do camundongo, do macaco rhesus e do chimpanzé, respectivamente.

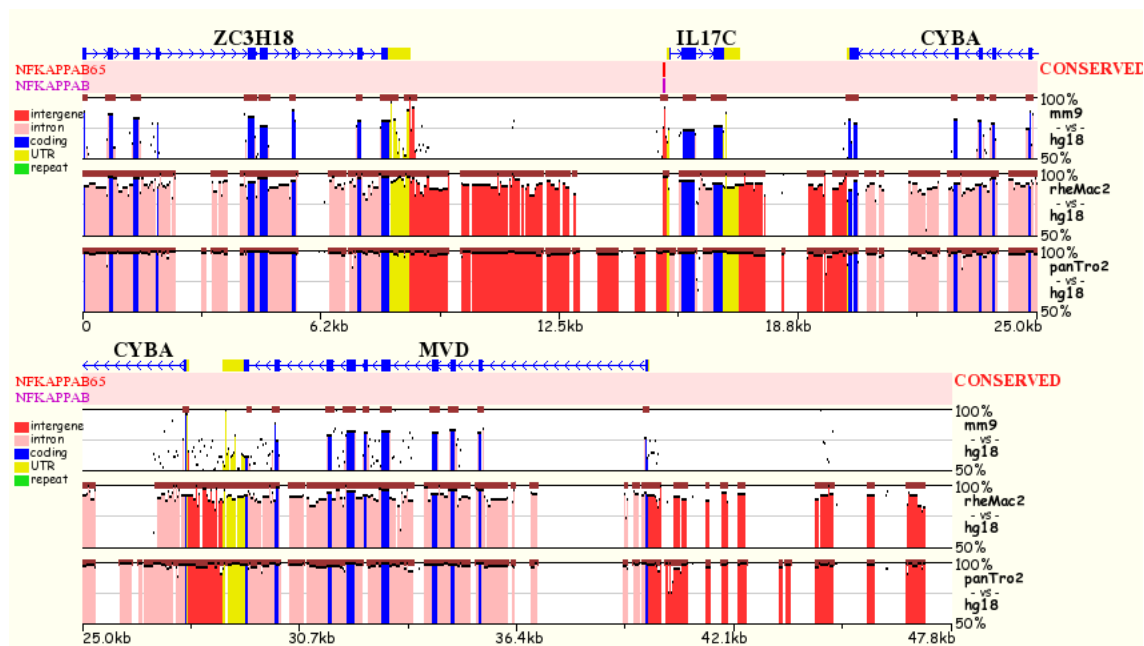


Figura 12. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr8:124876452-125083964), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr20:86719209-87003658), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr16:88960119-89086524) e o homem (*Homo sapiens*, hg18 chr16:87217199-87264958), com relação ao gene *CYBA*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>).

Quadro 02. Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr20:86719209-87003658), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr16:88960119-89086524) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr16:87217199-87264958), com relação ao gene *CYBA*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>). Os possíveis sítios de ligação para as subunidades p50 e/ou p65 localizados “upstream” ao gene *CYBA* e em região intergênica estão destacados em cinza.

1 V\$NFKAPPAB_01 - 2027-2036 AGGAAGTCCC - 59790-59799 AGGAAGTCCC - 62198-62207 AGGAAGTCCC
2 V\$NFKAPPAB_01 + 9957-9966 GGGAATTCCC + 68967-68976 GGAAATTCCC + 70657-70666 GGGAATTCCC
3 V\$NFKAPPAB50_01 - 9957-9966 GGGAATTCCC - 68967-68976 GGAAATTCCC - 70657-70666 GGGAATTCCC
4 V\$NFKAPPAB65_01 - 9957-9966 GGGAATTCCc - 68967-68976 GGAAATTCCc - 70657-70666 GGGAATTCCc
5 V\$NFKAPPAB_01 - 9957-9966 GGGAATTCCC - 68967-68976 GGAAATTCCC - 70657-70666 GGGAATTCCC
6 V\$NFKAPPAB65_01 - 9958-9967 GGAATTCCCa - 68967-68976 GGAAATTCCc - 70658-70667 GGAATTCCCa
7 V\$NFKAPPAB_01 + 10785-10794 GGGAAAACCC + 69750-69759 GGGAAAACCC + 71448-71457 GGGAAAACCC
8 V\$NFKAPPAB_01 - 10785-10794 GGGAAAACCC - 69750-69759 GGGAAAACCC - 71448-71457 GGGAAAACCC
9 V\$NFKAPPAB65_01 - 10786-10795 GGGAAAACCCa - 69751-69760 GGAAAACCCa - 71449-71458 GGGAAAACCCa
10 V\$NFKAPPAB50_01 + 10961-10970 GGGGAGACCC + 69933-69942 GGGGAGACCC + 71624-71633 GGGGAGACCC
11 V\$NFKAPPAB_01 + 11090-11099 GGGGCGTCCC + 70061-70070 GGGACGTCCC + 71753-71762 GGGGCGTCCC
12 V\$NFKAPPAB_01 - 20532-20541 GGAAGATCCC - 79877-79886 GGAAGATCCC - 82309-82318 GGAAGATCCC
13 V\$NFKAPPAB65_01 - 20547-20556 GGACACTCCc - 79892-79901 GGACACTCCc - 82324-82333 GGACACTCCc
14 V\$NFKAPPAB65_01 + 24301-24310 gGGAGGTTCC + 83495-83504 gGGAGGTTCC + 86129-86138 gGGAGGTTCC
15 V\$NFKAPPAB_01 + 24301-24310 GGGAGGTTCC + 83495-83504 GGGAGGTTCC + 86129-86138 GGGAGGTTCC
16 V\$NFKAPPAB50_01 + 24327-24336 GGGGCTGCCC + 83521-83530 GGGGTTGCCC + 86155-86164 GGGGCTGCCC
17 V\$NFKAPPAB_01 + 24327-24336 GGGGCTGCCC + 83521-83530 GGGGTTGCCC + 86155-86164 GGGGCTGCCC
18 V\$NFKAPPAB_01 + 24963-24972 GGGACACCCC + 84189-84198 GGGACACCCC + 86791-86800 GGGACACCCC
19 V\$NFKAPPAB50_01 - 24963-24972 GGGACACCCC - 84189-84198 GGGACACCCC - 86791-86800 GGGACACCCC
20 V\$NFKAPPAB_01 - 24963-24972 GGGACACCCC - 84189-84198 GGGACACCCC - 86791-86800 GGGACACCCC
21 V\$NFKAPPAB_01 - 27618-27627 GGGACACCCC - 86823-86832 GGGATACCCC - 89997-90006 GGGACACCCC
22 V\$NFKAPPAB_01 + 28283-28292 GGGGCCTCCC + 87417-87426 GGGGCCTCCC + 90662-90671 GGGGCCTCCC
23 V\$NFKAPPAB50_01 + 28505-28514 GGGGAGCCCC + 87638-87647 GGGGAGCCCC + 90884-90893 GGGGAGCCCC

(Continua)

Quadro 02. (Continuação).

24 V\$NFKAPPAB50_01 - 28505-28514 GGGGAGCCCC - 87638-87647 GGGGAGCCCC - 90884-90893 GGGGAGCCCC
25 V\$NFKAPPAB_01 - 28505-28514 GGGGAGCCCC - 87638-87647 GGGGAGCCCC - 90884-90893 GGGGAGCCCC
26 V\$NFKAPPAB65_01 - 29974-29983 GGAAACCCCg - 89034-89043 GGAAACCCCg - 92296-92305 GGAAACCCCg
27 V\$NFKAPPAB65_01 + 32141-32150 gGGTGTTC + 91417-91426 gGGTGTTC + 94371-94380 gGGTGTTC
28 V\$NFKAPPAB50_01 + 33114-33123 GGGGATTTC + 92386-92395 GGGGATTTC + 95612-95621 GGGGATTTC
29 V\$NFKAPPAB65_01 + 33114-33123 gGGGATTTC + 92386-92395 gGGGATTTC + 95612-95621 gGGGATTTC
30 V\$NFKAPPAB_01 + 33114-33123 GGGGATTTC + 92386-92395 GGGGATTTC + 95612-95621 GGGGATTTC
31 V\$NFKAPPAB65_01 - 33115-33124 GGGATTTCa - 92387-92396 GGGATTTCa - 95613-95622 GGGATTTCa
32 V\$NFKAPPAB_01 - 33285-33294 AGGAAGCCCC - 92562-92571 GGGAAGCCCC - 95783-95792 AGGAAGCCCC
33 V\$NFKAPPAB65_01 + 35460-35469 tGGGCTTC + 94749-94758 tGGGCTTC + 97955-97964 tGGGCTTC
34 V\$NFKAPPAB65_01 + 36783-36792 gGGACTTCA + 96090-96099 gGGACTTCA + 99276-99285 gGGACTTCA
35 V\$NFKAPPAB_01 + 36783-36792 GGGACTTCA + 96090-96099 GGGACTTCA + 99276-99285 GGGACTTCA
36 V\$NFKAPPAB_01 + 44322-44331 GGGGAAGCC + 103497-103506 GGGGAAGCC + 106800-106809 GGGGAAGCC
37 V\$NFKAPPAB65_01 - 44323-44332 GGGAAGCCa - 103498-103507 GGGAAGCCa - 106801-106810 GGGAAGCCa
38 V\$NFKAPPAB_01 + 44449-44458 GGGGCTTCCT + 103624-103633 GGGGCTTCCT + 106927-106936 GGGGCTTCCT

Legenda: Conferir legenda do Quadro 1.

(Conclusão)

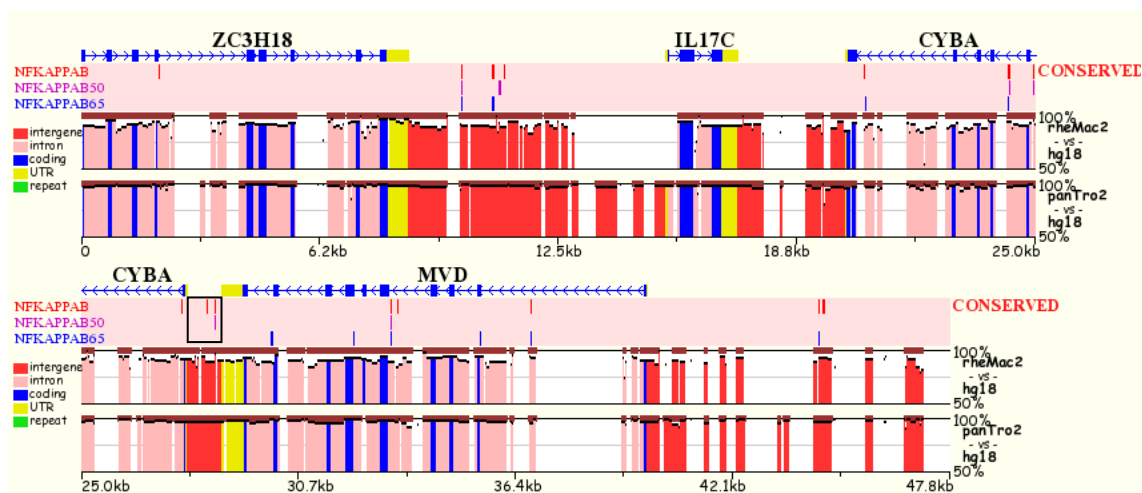


Figura 13. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr20:86719209-87003658), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr16:88960119-89086524) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr16:87217199-87264958), com relação ao gene *CYBA*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>). A região “upstream” ao gene *CYBA* e em região intergênica está destacada dentro do retângulo de borda de cor preta.

Quadro 03. Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr3:52035655-52247231), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr7:74367142-74612050) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr7:73806245-73861594), com relação ao gene *NCF1*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>). Os possíveis sítios de ligação para as subunidades p50 e/ou p65 localizados “upstream” ao gene *NCF1* e em região intergênica estão destacados em cinza.

1 V\$NFKAPPAB65_01 - 10138-10147 GGAAAGTCAc - 182161-182170 GGAAAGTCAc - 10706-10715 GGAAAGTCAc
2 V\$NFKAPPAB_01 - 10138-10147 GGAAAGTCAC - 182161-182170 GGAAAGTCAC - 10706-10715 GGAAAGTCAC
3 V\$NFKAPPAB_01 + 11739-11748 GGGAAACCCC + 183469-183478 GGGAAACCCC + 12789-12798 GGGAAACCCC
4 V\$NFKAPPAB50_01 - 11739-11748 GGGAAACCCC - 183469-183478 GGGAAACCCC - 12789-12798 GGGAAACCCC
5 V\$NFKAPPAB65_01 - 11739-11748 GGGAAACCCCc - 183469-183478 GGGAAACCCCc - 12789-12798 GGGAAACCCCc
6 V\$NFKAPPAB_01 - 11739-11748 GGGAAACCCC - 183469-183478 GGGAAACCCC - 12789-12798 GGGAAACCCC
7 V\$NFKAPPAB65_01 - 11740-11749 GGAAACCCct - 183470-183479 GGAAACCCct - 12790-12799 GGAAACCCct
8 V\$NFKAPPAB65_01 + 12996-13005 gGCAATTTCc + 184690-184699 gGCAATTTCc + 14044-14053 gGCAATTTCc
9 V\$NFKAPPAB_01 + 12996-13005 GGCAATTTCc + 184690-184699 GGCAATTTCc + 14044-14053 GGCAATTTCc
10 V\$NFKAPPAB_01 - 12997-13006 GCAATTTCc - 184691-184700 GCAATTTCc - 14045-14054 GCAATTTCc
11 V\$NFKAPPAB65_01 + 13318-13327 gGGAATTCCC + 185011-185020 gGGAGTCCC + 14366-14375 gGGAATTCCC
12 V\$NFKAPPAB_01 + 13318-13327 GGGGAATTCCC + 185011-185020 GGGAGTCCC + 14366-14375 GGGGAATTCCC
13 V\$NFKAPPAB_01 - 13318-13327 GGGGAATTCCC - 185011-185020 GGGAGTCCC - 14366-14375 GGGGAATTCCC
14 V\$NFKAPPAB50_01 + 14094-14103 GGGGATTTCc + 185779-185788 GGGGATTTCc + 15146-15155 GGGGATTTCc
15 V\$NFKAPPAB65_01 + 14094-14103 gGGGATTTCc + 185779-185788 gGGGATTTCc + 15146-15155 gGGGATTTCc
16 V\$NFKAPPAB_01 + 14094-14103 GGGGATTTCc + 185779-185788 GGGGATTTCc + 15146-15155 GGGGATTTCc
17 V\$NFKAPPAB_01 + 14095-14104 GGGATTTCCT + 185780-185789 GGGATTTCCT + 15147-15156 GGGATTTCCT
18 V\$NFKAPPAB_01 + 14881-14890 GGGGAATTCT + 186570-186579 GGGGAATTCT + 15933-15942 GGGGAATTCT
19 V\$NFKAPPAB_01 - 25948-25957 GGGAAGTCCC - 197934-197943 CGGAAGTCCC - 26996-27005 GGGAAGTCCC
20 V\$NFKAPPAB65_01 - 25949-25958 GGAAGTCCCc - 197935-197944 GGAAGTCCCc - 26997-27006 GGAAGTCCCc
21 V\$NFKAPPAB_01 - 25949-25958 GGAAGTCCC - 197935-197944 GGAAGTCCC - 26997-27006 GGAAGTCCC
22 V\$NFKAPPAB50_01 + 34131-34140 GGGGGTCCCC + 206140-206149 GGGGTCCCC + 35464-35473 GGGGGTCCCC
23 V\$NFKAPPAB50_01 - 34131-34140 GGGGGTCCCC - 206140-206149 GGGGTCCCC - 35464-35473 GGGGGTCCCC

Legenda: Conferir legenda do Quadro 1.

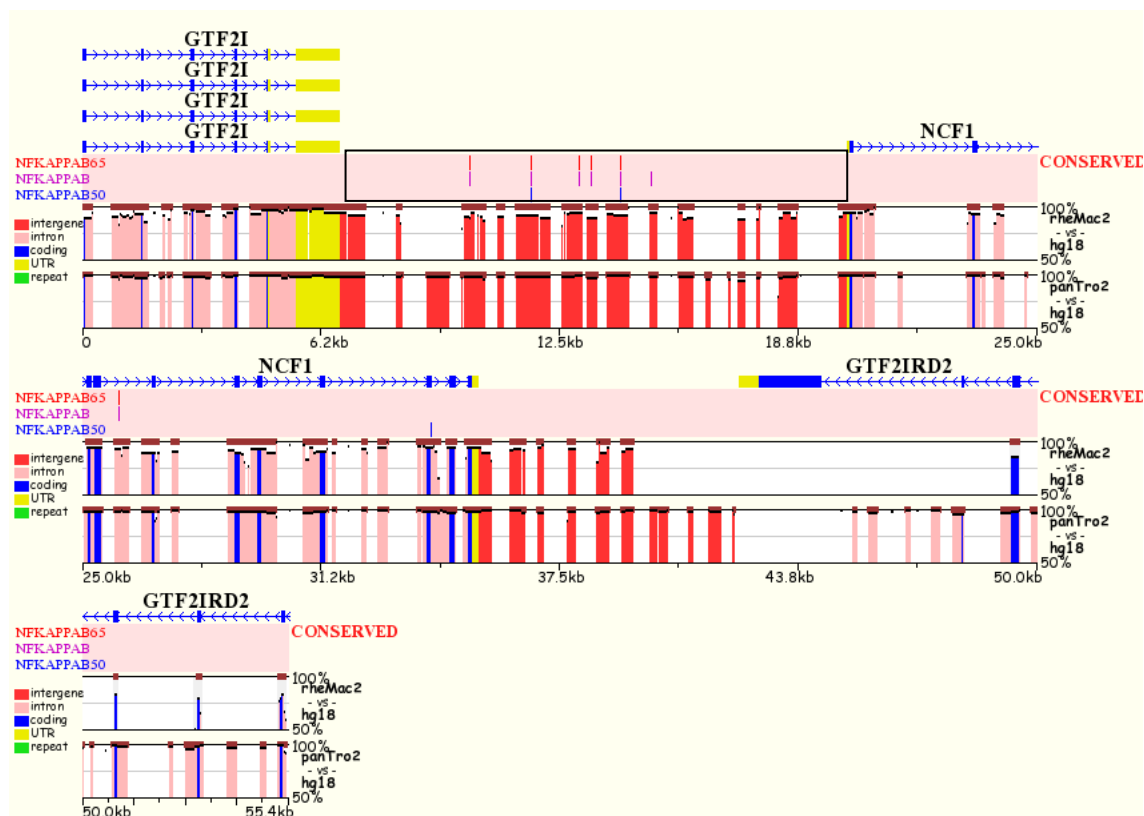


Figura 14. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr3:52035655-52247231), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr7:74367142-74612050) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr7:73806245-73861594), com relação ao gene *NCF1*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>). A região “upstream” ao gene *NCF1* e em região intergênica está destacada dentro do retângulo de borda de cor preta.

Quadro 04. Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr1:154574390-154773297), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr1:187040260-187085280), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr1:163100772-163315576) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr1:181771321-181846339), com relação ao gene *NCF2*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>).

<p>1 V\$NFKAPPAB65_01 + 30050-30059 cAGAATTTC - 104506-104515 GGAAATTCTc - 42969-42978 GGAAATTCTg + 169031-169040 cAGAATTTC</p>
--

Legenda: Conferir legenda do Quadro 1.

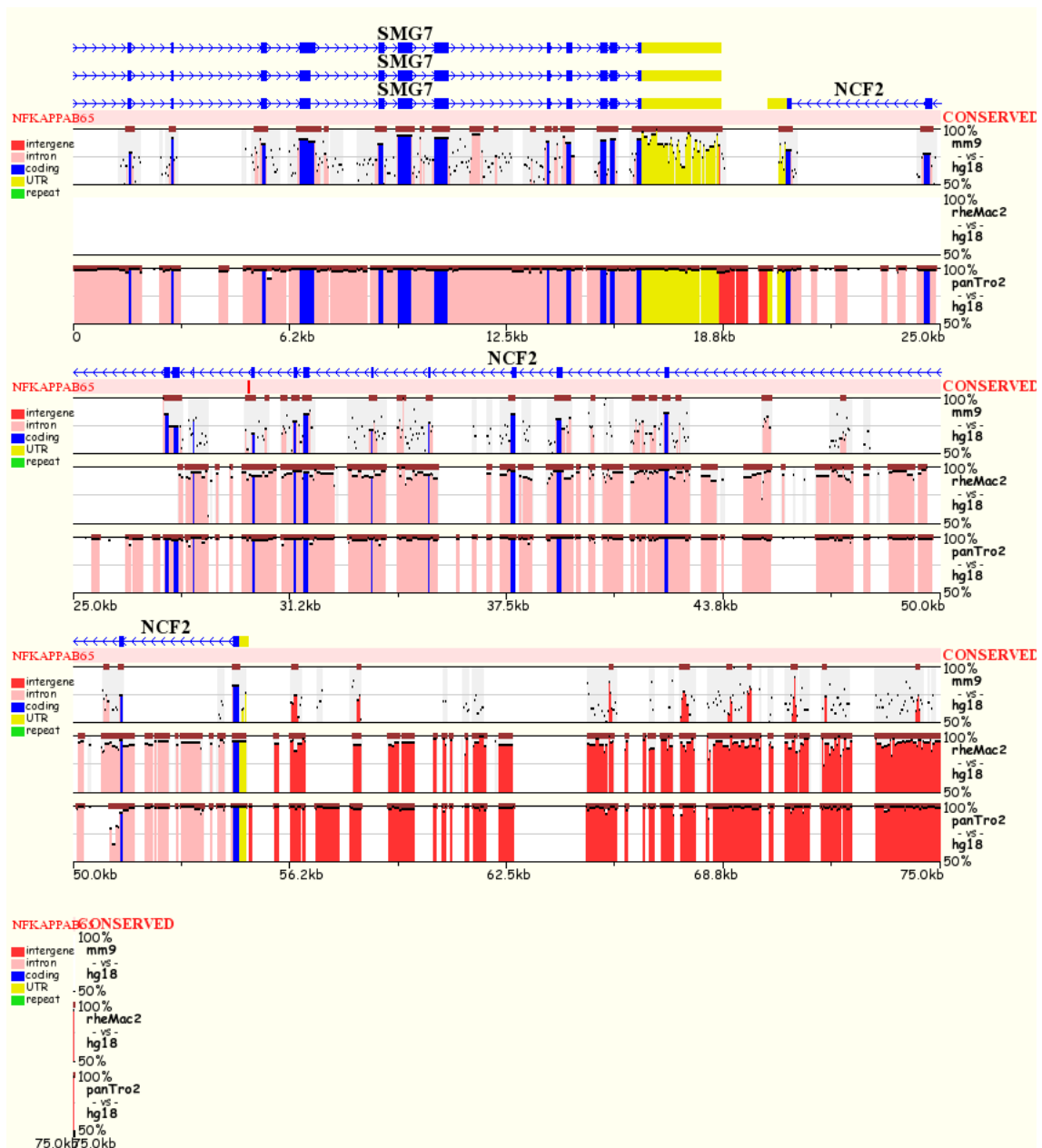


Figura 15. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr1:154574390-154773297), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr1:187040260-187085280), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr1:163100772-163315576) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr1:181771321-181846339), com relação ao gene *NCF2*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>).

Quadro 05. Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr1:187040260-187085280), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr1:163100772-163315576) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr1:181771321-181846339), com relação ao gene *NCF2*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>). Os possíveis sítios de ligação para as subunidades p50 e/ou p65 localizados “upstream” ao gene *NCF2* e em região intergênica estão destacados em cinza.

1 V\$NFKAPPAB65_01 + 30050-30059 cAGAATTTCC - 42969-42978 GGAAATTCTg + 169031-169040 cAGAATTTCC
2 V\$NFKAPPAB65_01 - 30494-30503 GGAAATCCAc + 42525-42534 gTGGATTTCC - 169475-169484 GGAAATCCAc
3 V\$NFKAPPAB_01 - 30494-30503 GGAAATCCAC + 42525-42534 GTGGATTTCC - 169475-169484 GGAAATCCAC
4 V\$NFKAPPAB65_01 - 32072-32081 GGAAGGTCCc + 40948-40957 gGGACCTTCC - 171051-171060 GGAAGGTCCc
5 V\$NFKAPPAB_01 - 32072-32081 GGAAGGTCCC + 40948-40957 GGGACCTTCC - 171051-171060 GGAAGGTCCC
6 V\$NFKAPPAB65_01 - 40624-40633 GGAAGGTCCc + 33119-33128 gGGACCTTCC - 179602-179611 GGAAGGTCCc
7 V\$NFKAPPAB_01 - 40624-40633 GGAAGGTCCC + 33119-33128 GGGACCTTCC - 179602-179611 GGAAGGTCCC
8 V\$NFKAPPAB_01 - 41089-41098 GCAAAGCCCC + 32657-32666 GGGGCTTTGC - 180067-180076 GCAAAGCCCC
9 V\$NFKAPPAB65_01 + 42391-42400 gGGAGTTTCT - 31356-31365 AGAAACTCCc + 181369-181378 gGGAGTTTCT
10 V\$NFKAPPAB65_01 + 47799-47808 gGGAATTTCT - 26575-26584 AGAAATTCCc + 187166-187175 gGGAATTTCT
11 V\$NFKAPPAB_01 + 47799-47808 GGGAATTTCT - 26575-26584 AGAAATTCCC + 187166-187175 GGGAATTTCT
12 V\$NFKAPPAB_01 - 54947-54956 GAAATGTCCC + 19125-19134 GGGACATTTc - 194789-194798 GAAATGTCCC
13 V\$NFKAPPAB50_01 + 68695-68704 GGGGAGGCC - 6332-6341 GGGCCTCCCC + 208487-208496 GGGGAGGCC
14 V\$NFKAPPAB65_01 + 71729-71738 gGGACTTTCA - 3344-3353 TGAAAGTCCc + 211520-211529 gGGACTTTCA
15 V\$NFKAPPAB_01 + 71729-71738 GGGACTTTCA - 3344-3353 TGAAAGTCCC + 211520-211529 GGGACTTTCA

(Continua)

Quadro 05. (Continuação).

16 V\$NFKAPPAB65_01 - 74455-74464 TGAAATCCCc + 549-558 gGGGATTTCa - 214241-214250 TGAAATCCCc
17 V\$NFKAPPAB_01 - 74455-74464 TGAAATCCCC + 549-558 GGGGATTTCa - 214241-214250 TGAAATCCCC

Legenda: Conferir legenda do Quadro 1.

(Conclusão)

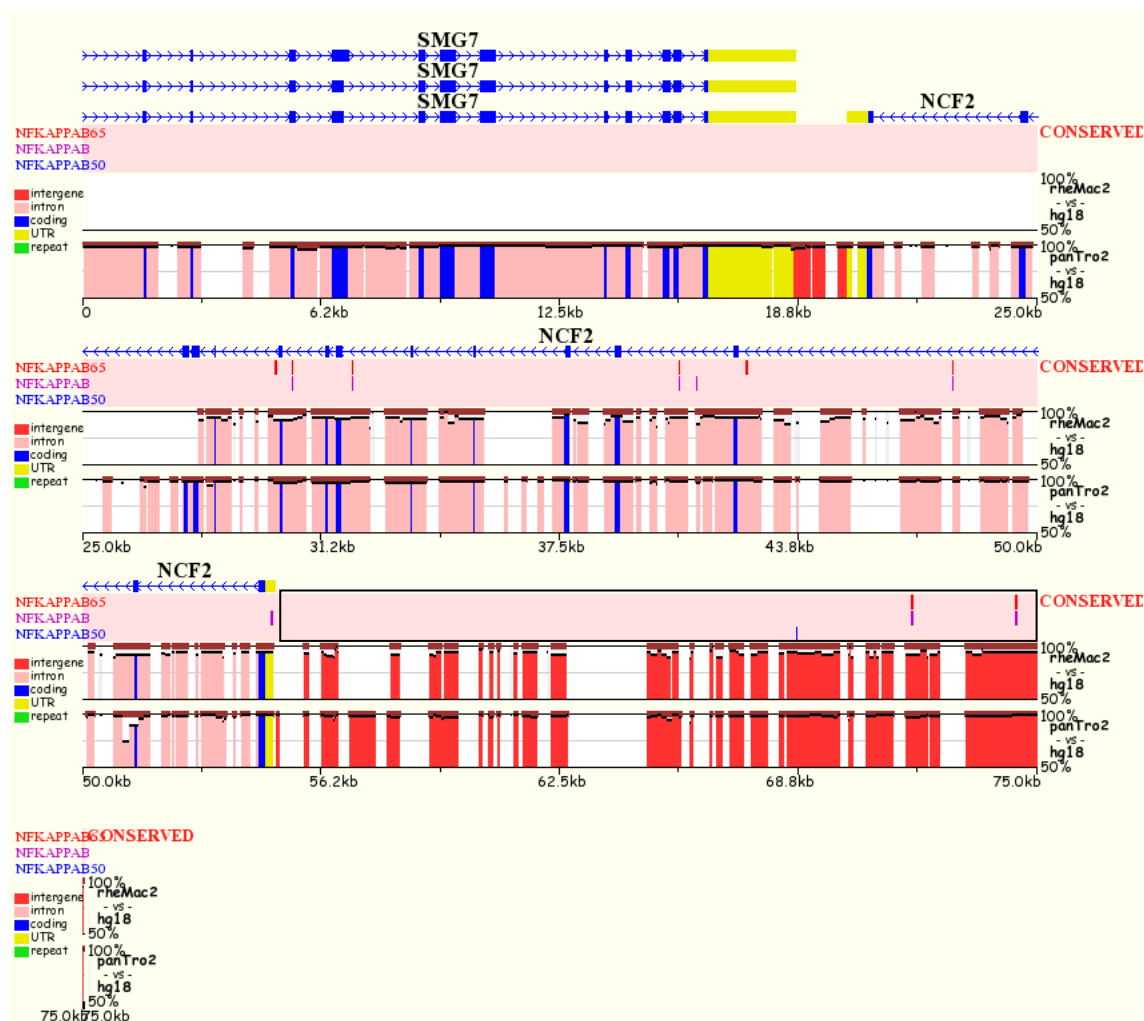


Figura 16. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr1:187040260-187085280), *P. troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr1:163100772-163315576) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr1:181771321-181846339), com relação ao gene *NCF2*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>). A região “upstream” ao gene *NCF2* e em região intergênica está destacada dentro do retângulo de borda de cor preta.

Quadro 06. Possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), e suas posições nos respectivos genomas, conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr15:78059777-78147445), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr10:80737925-80942585), *C. familiaris* (cachorro, canFam2 chr10:30645148-30701038) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr22:35566991-35624004), com relação ao gene *NCF4*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>). O possível sítio de ligação para a subunidade p65 localizada “upstream” ao gene *NCF4* e em região intergênica está destacado em cinza.

1 V\$NFKAPPAB65_01 + 16349-16358 gGGATTTTCC + 11278-11287 gGGATTTTCC - 47021-47030 GGAAAATCCc + 17518-17527 gGGATTTTCC
2 V\$NFKAPPAB_01 + 16349-16358 GGGATTTTCC + 11278-11287 GGGATTTTCC - 47021-47030 GGAAAATCCC + 17518-17527 GGGATTTTCC
3 V\$NFKAPPAB_01 - 16349-16358 GGGATTTTCC - 11278-11287 GGGATTTTCC + 47021-47030 GGAAAATCCC - 17518-17527 GGGATTTTCC
4 V\$NFKAPPAB65_01 + 51428-51437 gGGGTTTTCC + 44665-44674 gGGATTTTCC - 14665-14674 GGAAAGCCCc + 54012-54021 gGGGTTTTCC
5 V\$NFKAPPAB_01 + 51428-51437 GGGGTTTTCC + 44665-44674 GGGATTTTCC - 14665-14674 GGAAAGCCCC + 54012-54021 GGGGTTTTCC
6 V\$NFKAPPAB65_01 + 51563-51572 gGGACTTTCC + 44791-44800 gGGACTTTCC - 14527-14536 GGAAAGTCCc + 54147-54156 gGGACTTTCC
7 V\$NFKAPPAB_01 + 51563-51572 GGGACTTTCC + 44791-44800 GGGACTTTCC - 14527-14536 GGAAAGTCCC + 54147-54156 GGGACTTTCC

Legenda: Conferir legenda do Quadro 1.

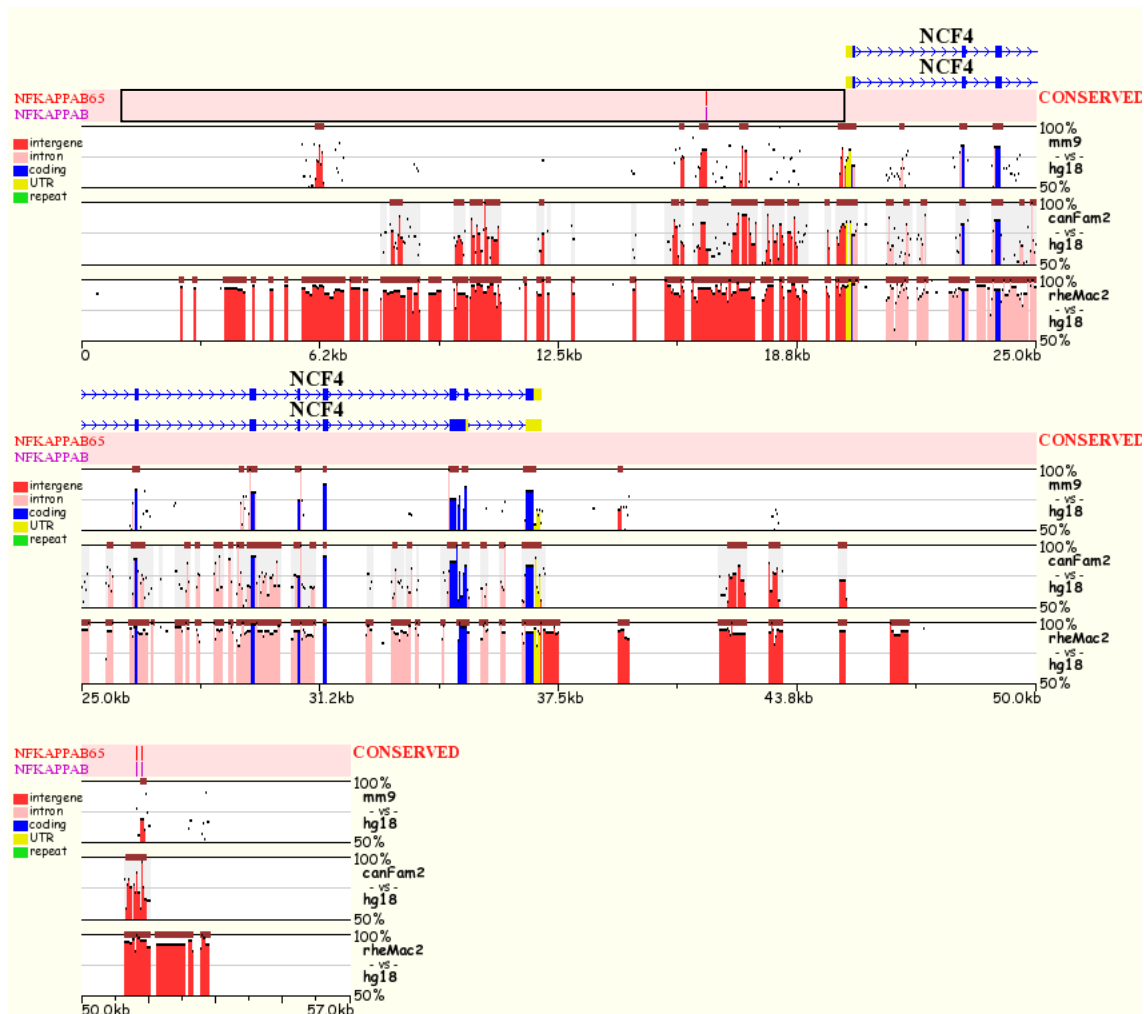


Figura 17. Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF- κ B (subunidades p50 e p65), conservados entre as espécies *M. musculus* (camundongo, mm9 chr15:78059777-78147445), *M. mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr10:80737925-80942585), *C. familiaris* (cachorro, canFam2 chr10:30645148-30701038) e o homem (*H. sapiens*, hg18 chr22:35566991-35624004), com relação ao gene *NCF4*. Análise computacional empregando a ferramenta “ECR Browser” (<http://ecrbrowser.dcode.org/>; <http://mulan.dcode.org/>). A região “upstream” ao gene *NCF4* e em região intergênica está destacada dentro do retângulo de borda de cor preta.

4.5 Avaliação da expressão dos genes *CYBA*, *NCF1* e *NCF2* pelo método de real-time PCR em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ e de pacientes com DGC autossômica recessiva

Para testar a hipótese de que efeitos supressores ao sistema NADPH oxidase poderiam ser encontrados em células com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ , nós examinamos os níveis de transcrição dos genes *CYBA*, *NCF1* e *NCF2* em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ , em comparação a linhagens celulares de doadores saudáveis e de pacientes com DGC autossômica recessiva.

Na Figura 18 A e B vemos que a expressão do gene *CYBA* não foi significativamente afetada dentre os materiais celulares provenientes dos diferentes pacientes com defeito nos receptores IFNGR1 ou IFNGR2, quando comparada à do controle positivo (doadores saudáveis) (estimulado ou não com IFN- γ). Também é mostrado que não houve aumento estatisticamente significativo da expressão do gene *CYBA* no grupo controle positivo estimulado por IFN- γ comparado ao grupo controle positivo não estimulado.

A Figura 19A mostra que a expressão do gene *NCF1* encontrou-se significativamente diminuída apenas nas células do paciente IFNGR1-c estimuladas ou não com IFN- γ , quando comparada à do controle positivo (estimulado ou não com IFN- γ). A expressão do gene *NCF1* em células de pacientes IFNGR1-pr e IFNGR1-pd, estimuladas ou não por IFN- γ , apresentou-se semelhante à encontrada no grupo controle positivo (estimulado ou não com IFN- γ). A Figura 19B mostra que a expressão do gene *NCF1* nos grupos de células provenientes dos pacientes IFNGR2-c (a) e IFNGR2-c (b) não foi significativamente aumentada por meio do estímulo de INF- γ , quando comparada à do grupo controle positivo estimulado por IFN- γ ou quando comparada à expressão gênica dos respectivos materiais não estimulados dos pacientes IFNGR2-c (a) e IFNGR2-c (b). Ocorreu uma

tendência de aumento da expressão do gene *NCF1* somente no grupo de células provenientes do paciente IFNGR2-pd estimuladas por IFN- γ .

Na Figura 20A, vemos que a expressão do gene *NCF2* encontrou-se significativamente diminuída nas células dos pacientes IFNGR1-c e IFNGR1-pr estimuladas com IFN- γ , quando comparada à expressão deste gene no grupo controle positivo estimulado com IFN- γ . Células destes mesmos pacientes, porém não estimuladas, não apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo não estimulado. A expressão do gene *NCF2* nas células do paciente IFNGR1-pd, estimuladas ou não com IFN- γ , não apresentou diferença significativa com relação ao grupo controle positivo estimulado ou não com IFN- γ . A Figura 20B mostra que a expressão do gene *NCF2* não foi significativamente afetada dentre os materiais celulares provenientes dos diferentes pacientes com defeitos no receptor IFNGR2, quando comparada à do controle positivo estimulado ou não com IFN- γ .

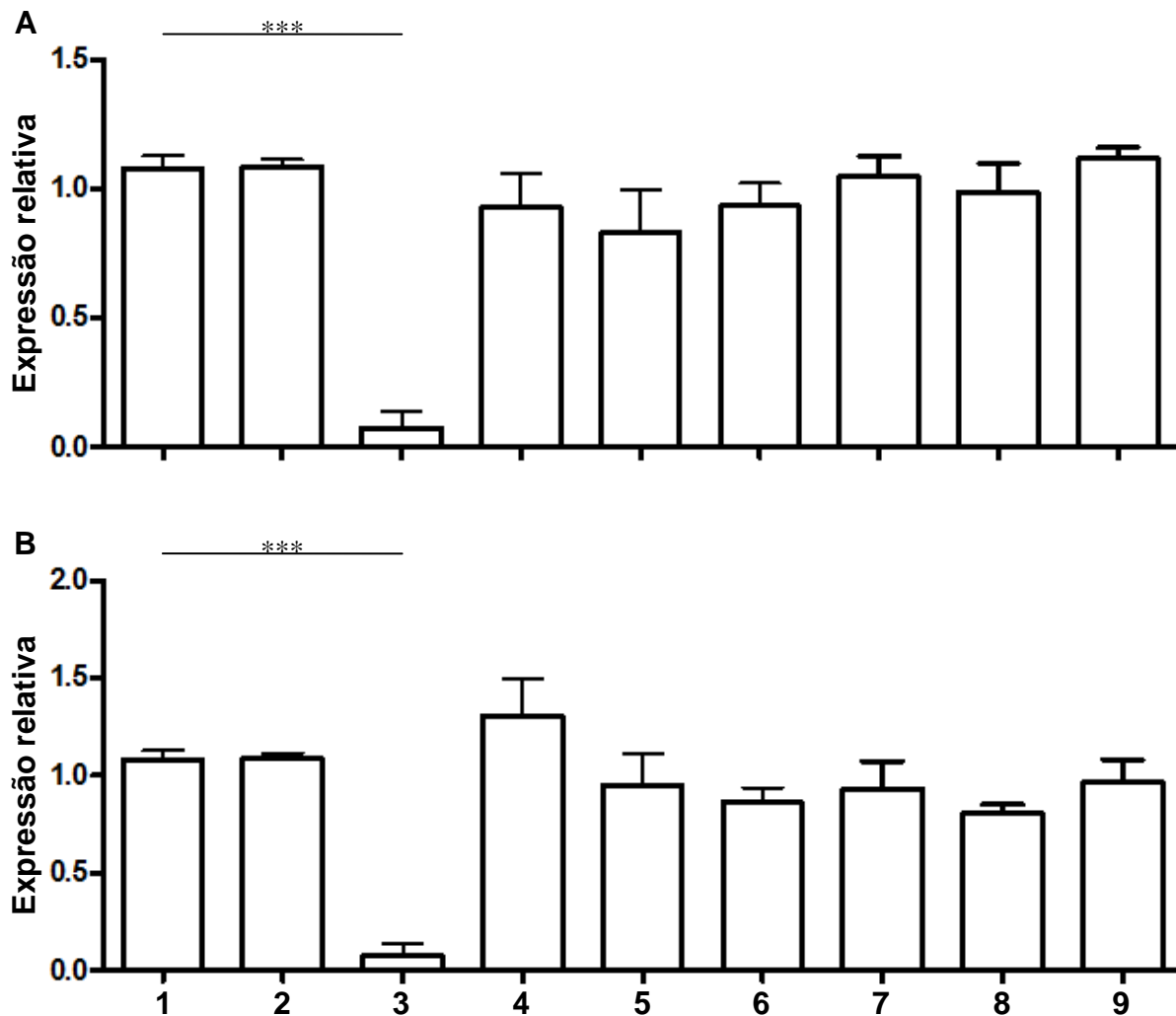


Figura 18. Expressão do gene *CYBA* em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ (ocorrência natural de mutações no receptor IFNGR1 ou IFNGR2) e de pacientes com DGC autossômica recessiva. Em **A** as linhagens de células B foram derivadas de: 1 e 2, doadores saudáveis; 3, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *CYBA*; 4 e 5, paciente IFNGR1-c; 6 e 7, paciente IFNGR1-pr; 8 e 9, paciente IFNGR1-pd. As células foram estimuladas (2, 5, 7 e 9) ou não (1, 3, 4, 6 e 8) com IFN- γ . Em **B** as linhagens de células B foram derivadas de: 1 e 2, doadores saudáveis; 3, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *CYBA*; 4 e 5, paciente IFNGR2-c (a); 6 e 7, paciente IFNGR2-c (b); 8 e 9, paciente IFNGR2-pd. As células foram estimuladas (2, 5, 7 e 9) ou não (1, 3, 4, 6 e 8) com IFN- γ (**p<0,001; n = 6; ANOVA mono-caudal, seguido pelo test *t* de Tukey).

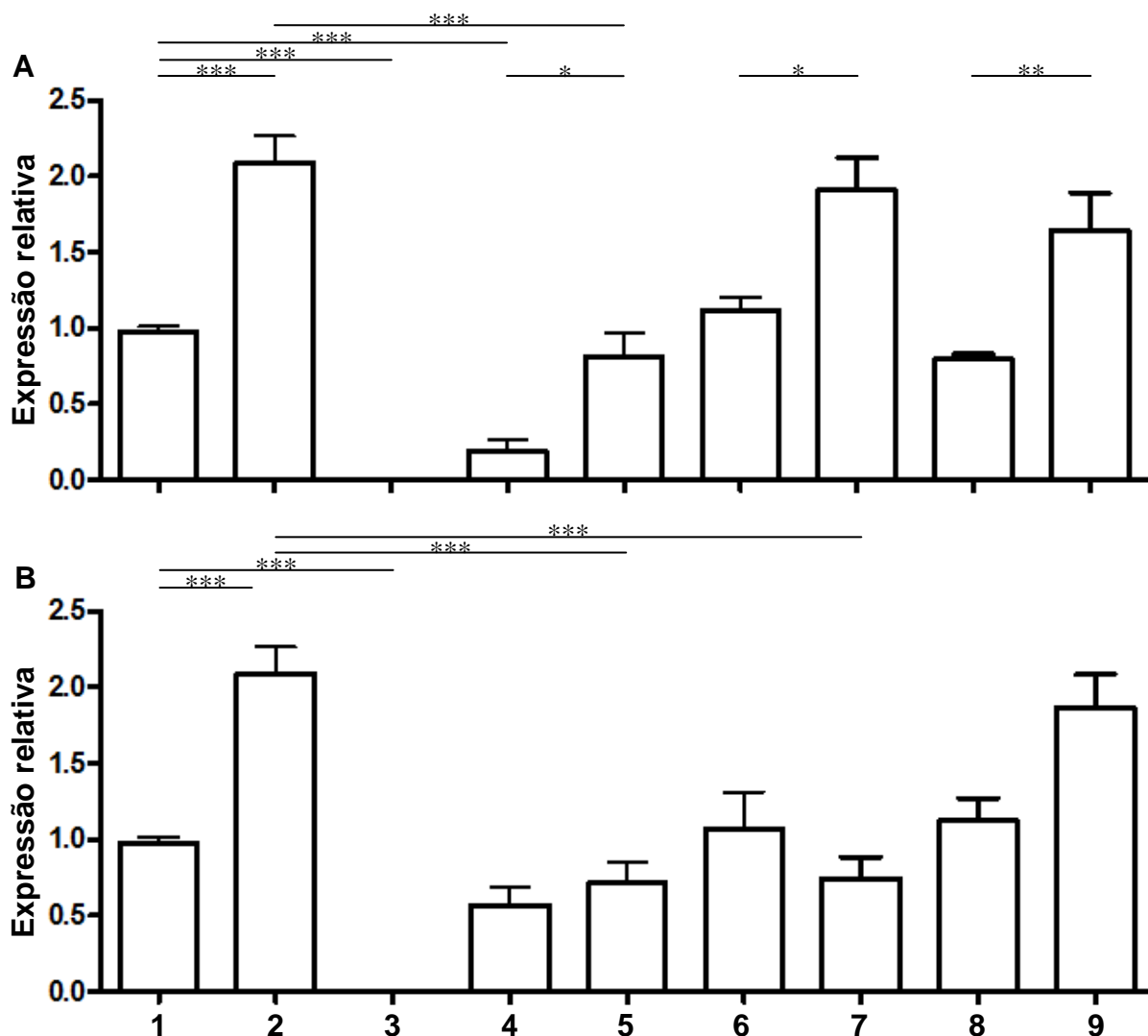


Figura 19. Expressão do gene *NCF1* em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ (ocorrência natural de mutações no receptor IFNGR1 ou IFNGR2) e de pacientes com DGC autossômica recessiva. Em **A** as linhagens de células B foram derivadas de: 1 e 2, doadores saudáveis; 3, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *NCF1*; 4 e 5, paciente IFNGR1-c; 6 e 7, paciente IFNGR1-pr; 8 e 9, paciente IFNGR1-pd. As células foram estimuladas (2, 5, 7 e 9) ou não (1, 3, 4, 6 e 8) com IFN- γ . Em **B** as linhagens de células B foram derivadas de: 1 e 2, doadores saudáveis; 3, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *NCF1*; 4 e 5, paciente IFNGR2-c (a); 6 e 7, paciente IFNGR2-c (b); 8 e 9, paciente IFNGR2-pd. As células foram estimuladas (2, 5, 7 e 9) ou não (1, 3, 4, 6 e 8) com IFN- γ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 6$; ANOVA mono-caudal, seguido pelo test *t* de Tukey).

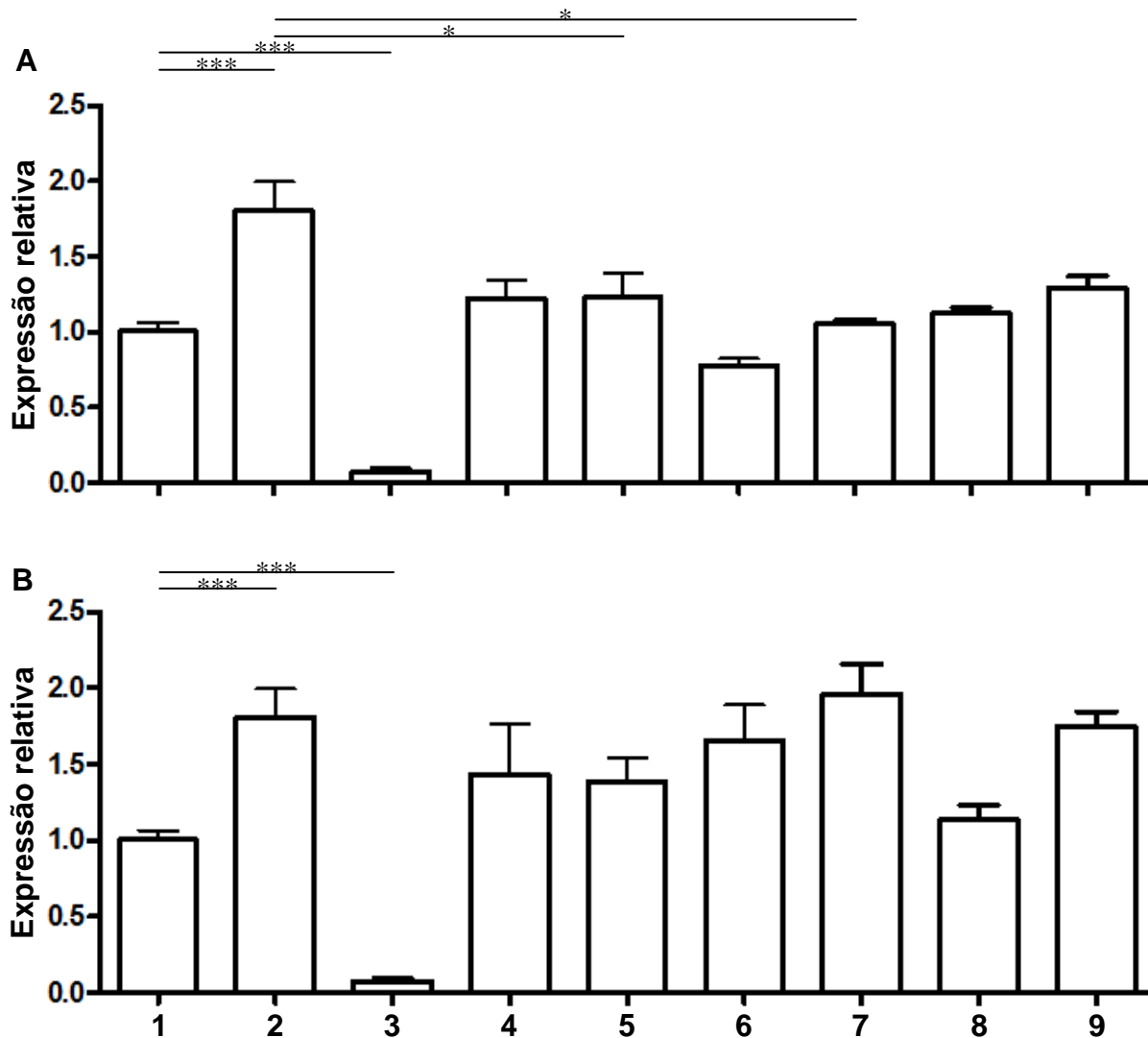


Figura 20. Expressão do gene *NCF2* em células B EBV transformadas de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ (ocorrência natural de mutações no receptor IFNGR1 ou IFNGR2) e de pacientes com DGC autossômica recessiva. Em **A** as linhagens de células B foram derivadas de: 1 e 2, doadores saudáveis; 3, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *NCF2*; 4 e 5, paciente IFNGR1-c; 6 e 7, paciente IFNGR1-pr; 8 e 9, paciente IFNGR1-pd. As células foram estimuladas (2, 5, 7 e 9) ou não (1, 3, 4, 6 e 8) com IFN- γ . Em **B** as linhagens de células B foram derivadas de: 1 e 2, doadores saudáveis; 3, paciente com DGC devido à mutação autossômica no gene *NCF2*; 4 e 5, paciente IFNGR2-c (a); 6 e 7, paciente IFNGR2-c (b); 8 e 9, paciente IFNGR2-pd. As células foram estimuladas (2, 5, 7 e 9) ou não (1, 3, 4, 6 e 8) com IFN- γ (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 6$; ANOVA mono-caudal, seguido pelo test *t* de Tukey).

5 DISCUSSÃO

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) foi descrito inicialmente por Sen e Baltimore em 1986 como uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B. Atualmente sabe-se que este fator também está envolvido na transcrição de diversos genes ligados à resposta inflamatória, entre outros genes envolvidos na apoptose e na transformação neoplásica celular (Skalnik, 2002; Walmsley, et al., 2005). O NF- κ B também está envolvido na cascata de sinalização ativada por diversos “Toll-like receptors” (Kawai e Akira, 2006). Alguns genes cuja expressão é controlada pelo NF- κ B estão descritos na literatura, dentre eles os mais conhecidos são: o fator de crescimento GM-CSF; as moléculas de adesão celular, MAd-CAM-1, ELAM-1, ICAM-1, VCAM; as citocinas IL-1, 2, 6, 8, TNF- α , INF- α e β ; anti-apoptóticos, TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1, c-IAP2, entre outros (Stein e Yang, 1995; Baldwin, 1996; Gerritsen, et al., 1997; Wang, et al., 1998; Mckay e Cidlowski, 1999).

O NF- κ B é um heterodímero composto por duas subunidades, uma proteína de 50 kDa, chamada de p50 ou NF- κ B1 e uma outra de 65 kDa chamada de p65 ou RelA, as quais representam o protótipo clássico do NF- κ B (Baeuerle e Henkel, 1994). Em outros tipos celulares não leucocitários ou células de outros organismos, como de insetos, estes dímeros podem ocorrer de outras formas promovendo diversas combinações heterodiméricas (p50/p52, p50/p105, p100/p529) e provavelmente combinações homodiméricas em células de mamíferos (p50/p50) (Fujita, et al., 1992; Moore, Ruben e Rosen, 1993).

Logo após a identificação do NF- κ B em 1988, Baeuerle e Baltimore identificaram outra proteína de 60 a 70 kDa de atividade inibitória chamada de I κ B, que especificamente associa-se a dímeros de NF- κ B, formando trímeros (p50/p65/I κ B) e impedindo que o NF- κ B se ligue ao DNA quando dentro do núcleo, e, além disso, essa forma trimérica obriga a retenção deste complexo no citoplasma (Rice, Mackichan e Israel, 1992; Verma, et al., 1995; Baldwin, 1996). Foram descritas várias proteínas

inibitórias englobando a família das IκBs (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκR-R, Bcl-3), entre outras (Haskill, et al., 1991; Inoue, et al., 1992).

O NF-κB pode ser ativado por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α e a IL-1, fatores ativadores de linfócitos T e B, LPS bacteriano, proteínas virais, fatores de crescimento e fatores indutores de estresse (Brown, et al., 1995; Carlsen, et al., 2002; Condino-Neto, Whitney e Newburger, 1998).

A ativação do NF-κB está associada à fosforilação das serinas 32 e 36 da IκB conduzindo à liberação do heterodímero (Brown, et al., 1995). Em seguida, a porção inibitória IκB é degradada pelo proteossomo após a ubiquinação da mesma (Traenckner, Wilk e Baeuerle, 1994; Krappmann, Wulczyn e Scheidereit, 1996; Didonato, et al., 1997; Mercurio, et al., 1997; Verma e Setevenson, 1997). Além da fosforilação da porção IκB, para a liberação do heterodímero, também ocorre a fosforilação do NF-κB como um mecanismo indireto de ativação, embora esse mecanismo não seja muito bem compreendido. Alguns autores relatam que após a fosforilação da serina 276 da subunidade p65, aumenta-se dramaticamente a atividade transcricional do NF-κB (Zhong, et al., 1997; Tak e Firestein, 2001).

Ativo, o NF-κB é translocado para o interior do núcleo, como um elemento regulador de transcrição gênica, ligando-se aos elementos *cis* ou elementos *trans* (Smith, et al., 1996; Merika, et al., 1998; Shimizu, et al., 1997; Siebenlist, Brown e Claudio, 2005).

O NF-κB é requerido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória, principalmente na resposta linfóide, a qual está bem relatada na literatura. Já na linhagem mielóide, existem poucos estudos sobre este fator de transcrição (D'acquistio, May e Ghosh, 2002). O NF-κB também é requerido para a transcrição de múltiplos genes relacionados ao desenvolvimento de anexos cutâneos (Ghosh, May e Kopp, 1998; Moynagh, 2005).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa (Luengo-Blanco, et al., 2008) mostraram que os inibidores de NF-κB dexametasona e

gliotoxina diminuíram a expressão gênica de *CYBB*. Além disso, o trabalho de Luengo-Blanco e colaboradores (2008) mostrou que houve diminuição da expressão do gene *CYBB* também em células U937 transfectadas com um “super inibidor” do NF- κ B (I κ B α S32A/S36A) e em células B imortalizadas de pacientes com EDA-ID devido a mutações em componentes da via do NF- κ B, encontrando, inclusive, sítio de ligação funcional para a subunidade p50 do NF- κ B à região “upstream” ao gene *CYBB*, confirmando estudos prévios também do nosso grupo de trabalho onde vimos que a dexametasona inibe o sistema NADPH oxidase em células THP-1 diferenciadas em monócitos/macrófagos pela inibição da expressão dos genes *CYBB* e *NCF1* (Condino-Neto, Whitney e Newburger, 1998). Parte dos resultados obtidos por mim e apresentados nesta dissertação já se encontram publicados no trabalho de Luengo-Blanco e colaboradores (2008).

Seguindo os resultados de uso de inibidores farmacológicos do NF- κ B em células THP-1 (Condino-Neto, Whitney e Newburger, 1998), dados obtidos pelos trabalhos de Anrather, Racchumi e Iadecola (2006), Gauss e colaboradores (2007) e pelo trabalho de Luengo-Blanco e colaboradores (2008) com relação à expressão do gene *CYBB* dependente do NF- κ B, no presente trabalho, investigamos a hipótese da possível influência do NF- κ B sobre a expressão dos genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4* do sistema NADPH oxidase e na fagocitose em modelo de células mielocíticas, tentando correlacionar este possível papel do NF- κ B com a doença granulomatosa crônica (DGC) e com a displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID).

Defeitos primários no sistema NADPH oxidase interferem com a atividade microbicida de células fagocíticas, levando ao fenótipo de DGC. A DGC é uma síndrome caracterizada por anormalidades genéticas nos genes codificadores do sistema NADPH oxidase, o que resulta na produção defeituosa de espécies reativas de oxigênio (Curnutte, 1993). A forma mais comum da DGC é causada por um defeito na gp91^{-phox} (56%), seguida por

defeitos na p47^{phox} (30%), p22^{phox} (5 a 7%) e p67^{phox} (5 a 7%) (Winkelstein, et al., 2000).

Embora nenhum paciente com DGC tenha sido identificado com defeitos no componente p40^{phox} da NADPH oxidase e esta não seja requerida para a atividade da deste complexo tanto em modelos experimentais “cell-free” quanto em modelos experimentais celulares, a p40^{phox} pode estar envolvida na modulação da atividade da NADPH oxidase devido à sua forte associação com a p67^{phox}, de acordo com as evidências que demonstram uma regulação positiva e/ou negativa da NADPH oxidase pela p40^{phox} (Matute, et al., 2005). Em sua revisão, Matute e colaboradores (2005) concluem que, apesar de ser dispensável para a atividade da NADPH oxidase “in vitro”, a p40^{phox} participa da atividade da NADPH oxidase “in vivo”, embora seu papel exato continue controverso.

Ellson e colaboradores (2006), através do estudo de neutrófilos de camundongos nocautes para a p40^{phox}, observaram que este defeito levou à redução da produção de ROS por estes neutrófilos, em resposta a *Staphylococcus aureus*, o que é semelhante ao encontrado na morte deste microorganismo “in vitro” e “in vivo” na DGC. Estes autores concluem que a p40^{phox} seria um componente essencial na morte de bactérias (Ellson, et al., 2006).

O modelo de células U937 utilizado no presente trabalho revelou a existência de influência significativa do NF- κ B sobre a expressão dos genes *NCF1* e *NCF2* do sistema NADPH oxidase, uma vez que a expressão dos mesmos encontrou-se diminuída na linhagem de células U937 transfectadas com o vetor cheio I κ B α S32A/S36A, comparando-se às linhagens de células U937 selvagem ou transfectadas com vetor vazio.

A I κ B α mutada (I κ B α S32A/S36A) não pode ser fosforilada em serinas chaves e isso evita a sua degradação pelo proteassomo. Esta I κ B mutada age como um “super inibidor” da atividade do NF- κ B, pois determina o seqüestro do NF- κ B no citoplasma celular (Asin, et al., 1999).

A diminuição da expressão dos genes *NCF1* e *NCF2* no modelo de células mielocíticas da linhagem U937 mostra que o NF- κ B é necessário para a expressão destes genes em níveis normais, e também mostra que não somente o NF- κ B está envolvido na expressão destes genes, uma vez que a diminuição da expressão dos mesmos não foi completa nas células U937 transfectadas com o vetor cheio.

Este resultado corrobora com dados prévios presentes na literatura onde já foi relatada a existência de evidências de que outros fatores transcripcionais também estariam envolvidos na expressão dos genes em questão (Para o gene *NCF1*, podemos citar: Li e colaboradores (1997); Marden e colaboradores (2003); Berasi e colaboradores (2004); Verbeek e colaboradores (1999); Ni e colaboradores (2007); e para o gene *NCF2*: Gauss, Bungler e Quinn (2002); Li e colaboradores (2001); Gauss e colaboradores (2005); Ammons e colaboradores (2007); Lindsey e colaboradores (2005)).

A fagocitose é regulada por uma diversidade de participantes, tais como receptores, proteínas quinases, proteínas efetoras, rearranjo de citoesqueleto e GTPases Rho. A NADPH oxidase é o complexo enzimático principal que segue à fagocitose, produzindo superóxido que pode inclusive levar à apoptose dos próprios fagócitos, quando produzido em excesso.

O reconhecimento e internalização de patógenos pelos macrófagos são ativados pela interação dos patógenos com receptores específicos como os receptores Fc γ (Fc γ Rs) e receptores de complemento (CRs), os quais desencadeiam a ativação de vias de sinalização distintas, e estas induzem processos de fagocitose distintos tanto morfológica quanto mecanisticamente (Aderem e Underhill, 1999). Dentre os receptores Fc γ que medeiam a fagocitose em humanos por meio do reconhecimento do domínio Fc das IgGs, incluem-se os receptores Fc γ RI, IIA e o Fc γ RIII (Ravetch, 1997). Os receptores de complemento que mediam a fagocitose reconhecem fragmentos C3b/C3bi (Aderem e Underhill, 1999). Outro tipo de receptor envolvido na fagocitose é o receptor que reconhece manose e

sacarídeos de fucose na cápsula de lipopolissacarídeos de bactérias invasoras (Brown, 1995). O reconhecimento celular de zimosan não-opsonizado é mediado pelos receptores de manose e β -glucanos (Giaimis, et al., 1993). O zimosan não-opsonizado também pode ser ingerido através do seu reconhecimento por CR3 (Le Cabec, et al., 2000), o domínio de lectina que se liga a β -glucanos solúveis e medeia a fagocitose de partículas contendo β -glucan, tais como o zimosan (Ross, et al., 1985). Brown e colaboradores (2002) mostraram que a dectin-1 é o receptor de reconhecimento de β -glucanos principal em macrófagos.

A formação de ânion superóxido durante a fagocitose se dá principalmente devido à ativação por FcRs. Entretanto, a estimulação de CR3 por partículas opsonizadas por anticorpos anti-CR3 (Serrander, et al., 1999), por partículas estafilocócicas opsonizadas por anticorpos anti-CD18 (Löfgren, et al., 1999), e por zimosan não opsonizado (Le Cabec, et al., 2000) também induzem a produção de ânion superóxido.

Partículas de zimosan opsonizadas por soro ou por IgG induzem apoptose em macrófagos. Esta apoptose é estritamente dependente da formação de ROS, que são gerados durante a fagocitose em macrófagos, levando à ativação da caspase-3 e à liberação de citocromo c (Kim, et al., 2003b). A ativação da caspase-3 pelo estímulo com partículas de zimosan opsonizadas por IgG ou por C3bi, e LPS mais IFN- γ em células J773A.1 também leva à apoptose destas células (Kim, et al., 2003b).

Park (2003) conclui que a fagocitose de partículas de zimosan opsonizadas por soro ou por IgG induz a formação de ânion superóxido, e que o excesso de superóxido causa a morte celular.

Para testar se a inibição da funcionalidade da via do NF- κ B (ou o processo de transfecção) causou um decréscimo geral de outras funções celulares, nós examinamos a habilidade de células U937 em ingerir partículas de zimosan. A atividade fagocítica frente às partículas de zimosan (opsonizadas ou não) foi similar entre todas as linhagens de células U937 estudadas, ocorrendo aumento significativo da atividade fagocítica das células quando na presença de partículas de zimosan

opsonizadas. Estes resultados são importantes, pois corroboram com dados prévios da literatura com respeito à funcionalidade de fagócitos na DGC. Quie, et al. (1967) mostraram que, na DGC, os fagócitos possuem sua capacidade bactericida diminuída, porém muitas outras funções fagocíticas, tais como a quimiotaxia, a fagocitose e a degranulação apresentam-se intactas nesse tipo celular. Assim, estes resultados ajudam na validação do nosso modelo experimental baseado nas células U937, uma vez que a expressão diminuída dos genes *NCF1* e *NCF2* na linhagem de células U937 I κ B S32A/S36A, o que caracterizaria um quadro de DGC, não trouxe mudanças na capacidade fagocítica destas células, comparadas às linhagens U937 controle.

A diminuição da atividade fagocítica no subgrupo de células U937 tratadas durante 48 horas com IFN- γ (100 U/mL) pode estar relacionada a uma superativação celular, a qual poderia levar ao estado de indução de apoptose celular e/ou fadiga com relação à atividade fagocítica nestas células, após o período de tratamento com esta citocina estimulatória.

Nossos resultados em células humanas mielocíticas confirmam e estendem os relatos prévios feitos por Anrather, Racchumi e Iadecola (2006) em um modelo murino, no qual observaram uma perda na atividade da NADPH oxidase em leucócitos, fibroblastos e células neuronais depois da super expressão de I κ B α ou em nocautes para p65/RelA.

Defeitos nos componentes da ativação do NF- κ B podem resultar em um grupo heterogêneo de imunodeficiências (Nishikomori, et al., 2004; Kim, et al., 2003a; Puel, et al., 2004; Puel, et al., 2006). Uma forma de ativação defeituosa do NF- κ B deriva de mutações hipomórficas em genes codificadores de proteínas quinases responsáveis pela fosforilação da I κ B no complexo I κ B quinase pela unidade regulatória NEMO. A síndrome clínica resultante, EDA-ID, pode ser herdada tanto como uma mutação recessiva ligada ao X quanto como uma mutação autossômica recessiva ou dominante (Nishikomori, et al., 2004; Kim, et al., 2003a; Puel, et al., 2004; Puel, et al., 2006).

Células B EBV transformadas mimetizam desordens genéticas da NADPH oxidase (Condino-Neto e Newburger, 1998; Volkman, et al., 1984) e provêm um modelo útil para a avaliação destas desordens moleculares. No presente estudo, usamos linhagens de células B imortalizadas produzidas a partir de células B de pacientes com EDA-ID para examinarmos os efeitos dos defeitos de ativação do NF- κ B herdados, sobre a função do sistema NADPH oxidase. Um dos pacientes com EDA-ID tem sua doença causada por uma mutação hipomórfica hemizigótica no gene que codifica NEMO/IKK γ (X420W), a subunidade regulatória do complexo I κ B quinase (IKK) (Döffinger, et al., 2001), levando ao decréscimo da ativação do NF- κ B nas células deste paciente. O outro paciente possui uma forma autossômica dominante de EDA-ID associada com uma mutação missense hipermórfica heterozigótica (S32I) na serina 32 da I κ B α (Courtois, et al., 2003). Esta mutação de ganho de função aumenta a capacidade inibitória da I κ B α pela prevenção de sua fosforilação e degradação, resultando no decréscimo da ativação do NF- κ B.

Células B EBV transformadas do paciente EDA-ID com a mutação S32I na I κ B α mostraram diminuição da expressão do gene *NCF1*, de maneira semelhante às células B de pacientes com DGC por deficiência na p47^{-phox}, corroborando os achados nas células U937 transfectadas com I κ B S32A/S36A. A expressão do *NCF1* nas linhagens celulares EDA-ID devido à mutação NEMO/IKK γ X420W também foi significativamente inferior a encontrada na linhagem celular de doadores saudáveis. Estes resultados sugerem um mecanismo adicional para a susceptibilidade a infecções por parte de pacientes com EDA-ID (Döffinger, et al., 2001; Dupuis-Girod, et al., 2002; Dupuis-Girod, et al., 2006; Courtois, et al., 2003), assim como o defeito molecular na ativação do NF- κ B também parece afetar células da linhagem mielóide.

Os experimentos de expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase em células B EBV transformadas de pacientes com DGC ligada ao X ou autossômica recessiva revelaram o que parece ser um mecanismo de tentativa de compensação da expressão defeituosa de um

determinado componente da NADPH oxidase pelo aumento da expressão gênica de outro determinado componente deste sistema. Isto pode ser observado, por exemplo, com respeito à expressão do gene *CYBA* em células B EBV transformadas de paciente com deficiência na expressão do gene *CYBB*. Outro exemplo deste fato encontra-se na expressão aumentada de *NCF2* nas linhagens celulares EDA-ID devido à mutação NEMO/*IKK γ* X420W, bem como nas linhagens de células B provenientes de pacientes com defeitos nos genes *CYBA* e *NCF1*.

Nossa investigação sobre possíveis sítios de ligação das subunidades p50 e/ou p65 do NF- κ B aos genes codificadores do sistema NADPH oxidase conservados entre o genoma humano e o de outras espécies animais evolutivamente mais ou menos próximas ao homem, sobre os quais podemos inferir a existência de funcionalidade biológica (Ovcharenko, et al., 2004; Ovcharenko, Stubbs e Loots, 2004; Ovcharenko, et al., 2005), resultou em achados interessantes.

Apesar de não encontrarmos possíveis sítios de ligação do NF- κ B conservados entre o genoma humano e os das espécies de peixes *Danio rerio* e *Fugu rubripes* nos genes estudados, o que poderia resultar numa ajuda a mais nas investigações sobre a existência de funcionalidade nos sítios conservados encontrados, uma vez que a grande distância evolutiva entre os peixes e o homem fornece um filtro adicional com o qual elementos funcionais não codificantes, tais como locais de ligação de fatores de transcrição, podem ser detectados com grande eficiência (Ovcharenko, Stubbs e Loots, 2004; Venkatesh, Gilligan e Brenner, 2000; Aparício, et al., 2002; Nóbrega, et al., 2003; Santagati, et al., 2003; Spitz, Gonzalez e Duboule, 2003), pudemos constatar a existência de possíveis sítios de ligação do NF- κ B conservados nas regiões “upstream” e intergênicas em relação aos genes *CYBA* (2 sítios específicos para a p50 conservados entre o genoma humano e o das espécies *M. mulatta* e *P. troglodytes*), *NCF1* (2 sítios específicos para a p50 e 6 específicos para a p65 conservados entre o genoma humano e o das espécies *M. mulatta* e *P. troglodytes*), *NCF2* (1 sítio específico para a p50 e 2 específicos para a p65

conservados entre o genoma humano e o das espécies *M. mulatta* e *P. troglodytes*) e *NCF4* (1 sítio específico para a p65 conservado entre o genoma humano e o das espécies *M. musculus*, *M. mulatta* e *C. familiaris*).

As regiões promotoras dos genes encontrados em eucariotos são compostas por um “TATA box”, o qual geralmente encontra-se a 30 pares de bases do sítio de início de transcrição gênica. Usualmente podem ser encontrados dois ou mais elementos promotores proximais à 100 e 200 pares de bases “upstream” ao sítio de início de transcrição. Como as regiões gênicas promotoras estão localizadas na região flanqueadora “upstream” intergênica às regiões transcritas dos genes, a ocorrência de possíveis sítios de ligação do NF- κ B conservados nesta localização poderia fornecer-nos subsídios para a realização de experimentos de bancada (tais como ensaios EMSA, do Inglês: “Electro Mobility Shift Assay”) sobre a funcionalidade dos mesmos.

Apesar de encontrarmos uma região consenso evolutivamente conservada para a subunidade p65 do NF- κ B “upstream” e intergênica ao gene *NCF4* e 2 sítios específicos para a p50 também evolutivamente conservados, “upstream” e em região intergênica com relação ao gene *CYBA*, a expressão destes genes não foi significativamente afetada pela ausência de NF- κ B funcional em nosso modelo experimental de células U937. A expressão do gene *CYBA* também não foi significativamente afetada em células de pacientes com EDA-ID. Assim, estas regiões evolutivamente conservadas para a ligação de subunidades do NF- κ B parecem não ser funcionais. A região consenso para o NF- κ B dentro da região “upstream” ao gene *CYBA* relatada por Moreno e colaboradores (2003), parece não ser uma região funcional para este fator de transcrição.

A ocorrência de 2 sítios específicos para a p50 e 6 específicos para a p65 na região intergênica “upstream” ao gene *NCF1* e de 1 sítio específico para a p50 e 2 específicos para a p65 na região intergênica “upstream” ao gene *NCF2*, todos evolutivamente conservados entre os genomas das espécies de *M. mulatta*, *P. troglodytes* e o homem, segundo a ferramenta “ECR Browser”, corroborou com os dados encontrados pelas demais

análises realizadas no presente trabalho com respeito à expressão destes genes em células U937 e de pacientes com EDA-ID onde alterações da via do NF- κ B levaram ao decréscimo da expressão destes genes. O fato dos possíveis sítios de ligação para as subunidades do NF- κ B estudadas aqui se encontrarem bem distantes da região de início de transcrição dos genes *NCF1* e *NCF2*, nos indica que, se funcionais, estes sítios podem servir à ação do NF- κ B como “enhancer” sobre a transcrição destes genes.

Parte do conjunto de doenças antes denominadas Susceptibilidade Mendeliana à Doenças Micobacterianas (referida em Inglês pela sigla MSMD, MIM 209950 (Hamosh, et al., 2005) (também conhecidas pela denominação genérica de defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ) também é originada devido a defeitos num dos componentes de ativação do NF- κ B, especificamente mutações no gene *NEMO*, como relatado por Filipe-Santos e colaboradores (2006a).

A existência de evidências na literatura científica sobre a influência do INF- γ na ativação do sistema NADPH oxidase (Wolfort, Stokes e Granger, 2008), seu uso no tratamento da DGC causada por defeitos de “splicing” no gene *CYBB* (Condino-Neto e Newburger, 2000; Ishibashi, et al., 2001; Errante, Frazão e Condino-Neto, 2008) e a influência de defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ sobre a expressão do gene *CYBB* (Prando, 2008), motivou-nos a investigar a hipótese de que defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ , especificamente, defeitos nos receptores IFNGR1 e IFNGR2, poderiam influenciar o sistema NADPH oxidase a partir da expressão dos seus componentes p22^{-phox}, p47^{-phox} e p67^{-phox}. Nesta investigação, utilizamos células B imortalizadas de pacientes com mutações nos componentes do eixo IL-12/23-IFN- γ conforme informado na Tabela 3.

Observando-se conjuntamente, os defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ estudados aqui confirmam nossa hipótese de que tais defeitos poderiam influenciar o sistema NADPH oxidase a partir da expressão dos seus componentes, no caso, os componentes p47^{-phox} e p67^{-phox}.

O receptor IFNGR1 possuiu influência marcante sobre a expressão do gene *NCF1*, uma vez que, na linhagem de células B provenientes de

paciente com defeito completo do receptor 1 do IFN- γ , até mesmo a expressão basal deste gene encontrou-se significativamente diminuída com relação ao controle positivo não estimulado. O receptor 2 do IFN- γ com os defeitos completos presentes nos pacientes IFNGR2-c (a) e IFNGR2-c (b) também ocasionou a ausência de aumento da expressão do gene *NCF1* estimulada por INF- γ . O defeito completo do receptor 1 do IFN- γ e o defeito parcial deste receptor (IFNGR1-pr), também impediu o aumento significativo da expressão do gene *NCF2* frente ao estímulo com IFN- γ .

A MSMD é definida por doença clínica severa causada por espécies de micobactérias fracamente virulentas, tais como vacinas de BCG e micobactérias não tuberculínicas (Levin, et al., 1995; Casanova, et al., 1995; Casanova, et al., 1996; Dorman e Holland, 2000; Casanova e Abel, 2002). Nesta síndrome, também há doenças causadas por espécies tifoidais e não-tifoidais de *Salmonella* (Dorman e Holland, 2000; Casanova Abel, 2002; MacLennan, et al., 2004). Mutações nos receptores IFNGR1 e IFNGR2 estão associadas a infecções micobacterianas, sendo as mutações no IFNGR1 (60 pacientes) mais prevalentes do que as mutações no IFNGR2 (4 pacientes). Os patógenos mais freqüentes em pacientes com mutações no IFNGR1 são as micobactérias ambientais e o bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Rosenzweig e Holland 2005). Nossos resultados acerca da hipótese de influência dos defeitos nos receptores IFNGR1 e IFNGR2 sobre a expressão dos genes *NCF1* e *NCF2* dão sustentação à sobreposição clínica de susceptibilidade a micobactérias por parte de pacientes com DGC e pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ (Rosenzweig e Holland, 2005; Alcais, et al., 2005; Lau, et al., 1998; Movahedi, et al., 2004; Bustamante, et al., 2007; Barese, et al., 2004).

Pneumococcus sp. é o mais comum dos agentes infecciosos em pacientes com EDA-ID, encontrado em mais de 80% dos pacientes (Döffinger, et al., 2001; Courtois, et al., 2003; Winkelstein, et al., 2000), enquanto que *Pneumococcus* sp. e outros microorganismos catalase-positivos não são associados com a DGC (Winkelstein, et al., 2000). No entanto, *Staphylococcus* sp. é tanto o segundo agente infeccioso mais

causador de doenças em pacientes com EDA-ID quanto o patógeno mais freqüente em pacientes com DGC. Pacientes com EDA-ID também mostram aumento na susceptibilidade a infecções por micobactéria (Döffinger, et al., 2001; Dupuis-Girod, et al., 2002; Filipe-Santos, et al., 2006b). A EDA-ID ligada ao X devido à mutação hipermórfica no NEMO foi primeiramente reportada em um garoto que morreu de tuberculose (Frix e Bronson, 1986), mas pacientes com EDA-ID freqüentemente se apresentam com infecções causadas por micobactérias menos virulentas, tais como *M. avium* (Filipe-Santos, et al., 2006b). Pacientes com DGC são susceptíveis a *Mycobacterium tuberculosis* (Alcais, et al., 2005; Lau, et al., 1998; Movahedi, et al., 2004; Bustamante, et al., 2007; Barese, et al., 2004) e, em regiões onde são feitas imunizações com o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), estes pacientes freqüentemente apresentam reações adversas a esta imunização.

O presente estudo sugere que defeitos comuns na atividade da NADPH oxidase podem prover uma base para a sobreposição clínica existente entre casos de DGC, EDA-ID e defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ . As diferenças fenotípicas provavelmente ocorrem porque o NF- κ B é um fator de transcrição ubíquo no sistema imunológico, envolvido na expressão de genes relacionados não somente à imunidade inata, mas também à imunidade adquirida. Entretanto, como a literatura médica apresenta descrições de cerca de 3000 pacientes com DGC, mas somente aproximadamente 40 pacientes com EDA-ID (alialis, somente recentemente a EDA-ID foi classificada como uma imunodeficiência primária independente, World Health Organization, 1999) e pouco mais de 220 pacientes com MSMD, atualmente, a comparação de fenótipos clínicos só pode ser especulada. Ainda não é sabido se os patógenos mais comuns nas infecções encontradas em pacientes com DGC ameaçam a maioria dos pacientes com EDA-ID, ou somente a um subconjunto destes pacientes com mutações específicas. Em particular, doenças estafilocóccicas, que são comuns tanto em pacientes com DGC quanto em pacientes com EDA-ID, podem, em parte, refletir diminuição na função do “burst” respiratório.

Esta hipótese será testada em futuros trabalhos sobre a função fagocítica em leucócitos de pacientes com mutações no NEMO, com variados graus de severidade.

As concordâncias sobre a inibição da expressão dos genes *CYBB*, relatado por Prando (2008), e a inibição da expressão dos genes *NCF1* e *NCF2*, relatados no presente estudo, tornam claro o envolvimento do sistema NADPH oxidase na origem de patologias ocorrentes em pacientes com defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ , de acordo com o nosso modelo de estudo.

Futuros estudos examinando fagócitos de pacientes EDA-ID e com defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ , com relação ao “burst” oxidativo e à atividade microbicida ajudarão na correlação entre mutações específicas na via de ativação do NF- κ B, moléculas relacionadas ao eixo IL-12/23-IFN- γ e defeitos bioquímicos, assim como sua relação com agentes causadores de infecções.

6 CONCLUSÕES

1. O NF- κ B é necessário para a expressão dos genes *NCF1* e *NCF2* e, conseqüentemente, para a atividade da NADPH oxidase;

2. As análises computacionais sobre os possíveis sítios de ligação funcionais para as subunidades p50 e/ou p65 do NF- κ B nas regiões “upstream” aos genes estudados, juntamente com os dados de expressão gênica obtidos nos modelos de linhagens celulares empregados, apontam para uma possível ligação funcional do NF- κ B aos genes *NCF1* e *NCF2*;

3. Defeitos na via de ativação do NF- κ B encontrados em certas formas de displasia ectodérmica levam a um defeito funcional similar ao encontrado em leucócitos de pacientes com DGC, em adição aos conhecidos defeitos imunológicos, e podem contribuir para agravar esta imunodeficiência;

4. Defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ também prejudicam a expressão dos genes *NCF1* e *NCF2*. O sistema NADPH oxidase também está comprometido nos pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ , especificamente, defeitos nos receptores IFNGR1 e IFNGR2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abinun M. Ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Arch Dis Child*. 1995;73:185.

Abinun M, Spickett G, Appleton AL, Flood T, Cant AJ. Anhidrotic ectodermal dysplasia associated with specific antibody deficiency. *Eur J Pediatr*. 1996;155:146-7.

Aderem A, Underhill DM. Mechanism of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.

Alcais A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med*. 2005;202:1617-21.

Altare F, Lammas D, Revy P, Jouanguy E, Döffinger R, Lamhamedi S, et al. Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guérin and Salmonella enteritidis disseminated infection. *J Clin Invest*. 1998a;102:2035-40.

Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*. 1998b;280:1432-5.

Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, Gonzalez-Aller C, Hiester A, de Boer M, Harbeck RJ, Oyer R, Johnson GL, Roos D. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:4654-9.

Ammons MC, Siemsen DW, Nelson-Overton LK, Quinn MT, Gauss KA. Binding of pleomorphic adenoma gene-like 2 to the tumor necrosis factor (TNF)-alpha-responsive region of the NCF2 promoter regulates p67(phox) expression and NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*. 2007;282:17941-52.

Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem*. 2006;281:5657-67.

Anumba DO, Robson SC, Boys RJ, Ford GA. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol*. 1999;277:H848-54.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, Christoffels A, Rash S, Hoon S, Smit A, et al. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*. 2002;297:1301-10.

Asin S, Taylor JA, Trushin S, Bren G, Paya CV. IkappaB mediates NF-kappaB activation in human immunodeficiency virus-infected cells. *J Virol*. 1999;73:3893-3903.

Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*. 2008;263:591-6.

Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:42-7.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signalling. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:563-91.

Baehner RL, Johnston RB Jr, Nathan DG. Comparative study of the metabolic and bactericidal characteristics of severely glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient polymorphonuclear leukocytes and leukocytes from children with chronic granulomatous disease. *J Reticuloendothel Soc*. 1972;12:150-69.

Baehner RL, Kunkel LM, Monaco AP, Haines JL, Conneally PM, Palmer C, Heerema N, Orkin SH. DNA linkage analysis of X chromosome-linked chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:3398-3401.

Baeuerle PA, Baltimore D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*. 1988;242:540-6.

Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:141-79.

Baldwin ASJR. The NF κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.

Barese C, Copelli S, Zandomeni R, et al. X-linked chronic granulomatous disease: first report of mutations in patients of Argentina. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26:656-60.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87:245-313.

Bei L, Lu Y, Eklund EA. HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91phox during myeloid differentiation. *J Biol Chem*. 2005;280:12359-70.

Bengtsson SH, Gulluyan LM, Disting GJ, Drummond GR. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30:849-54.

Berasi SP, Xiu M, Yee AS, Paulson KE. HBP1 repression of the p47phox gene: cell cycle regulation via the NADPH oxidase. *Mol Cell Biol.* 2004;24:3011-24.

Bianca VD, Dusi S, Bianchini E, Dal Pra I, Rossi F. Beta-amyloid activates the O₂- forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1999;274:15493-99.

Bourguignon SC, Alves CR, Giovanni-De-Simone S. Detrimental effect of nitric oxide on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* like cells. *Acta Trop.* 1997;66:109-18.

Brennan P, Donev R, Hewamana S. Targeting transcription factors for therapeutic benefit. *Mol Biosyst.* 2008;4:909-19.

Bridges RA, Berendes H, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood. The clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. *Am J Dis Child.* 1959;97:387-408.

Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I κ B proteolysis by site-specific signal-induced phosphorylation. *Science.* 1995;267:1485-88.

Brown EJ. Phagocytosis. *BioEssay.* 1995;17:109-17.

Brown MC, Tomaras GD, Vincenti MP, Taffet SM. Two forms of NF-kappa B1 (p105/p50) in murine macrophages: differential regulation by lipopolysaccharide, interleukin-2, and interferon-gamma. *J Interf Cyt Res.* 1997;17:295-306.

Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong SY, Gordon S. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med.* 2002;196:407-12.

Brown JR, Goldblatt D, Buddle J, Morton, Thrasher AJ. Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis in chronic granulomatous disease. *J Leukoc Biol.*, 2003;73:591-9.

Bryk R, Wolff DJ. Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivators and related inhibitors. *Pharmacol Ther.* 1999;2:157-78.

Bustamante J, Aksu G, Vogt G, et al. BCG-osis and tuberculosis in a child with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:32-8.

Butchar JP, Parsa KV, Marsh CB, Tridandapani S. IFN γ enhances IL-23 production during *Francisella* infection of human monocytes. *FEBS Lett.* 2008;582:1044-8.

Carlsen H, Moskaug JOL, Fromm SH, Blomhoff R. In vivo imaging of NF κ B activity. *J Immunol*. 2002;168:1441-6.

Casanova JL, Jouanguy E, Lamhamedi S, Blanche S, Fischer A. Immunological conditions of children with BCG disseminated infection. *Lancet*. 1995;346:581.

Casanova JL, Blanche S, Emile JF, Jouanguy E, Lamhamedi S, Altare F, et al. Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guérin infection: a French national retrospective study. *Pediatrics*. 1996;98:774-8.

Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:581-620.

Cassatella MA, Flynn RM, Amezcaga MA, Bazzoni F, Vicentini F, Trinchieri G. Interferon gamma induces in human neutrophils and macrophages expression of the mRNA for the high affinity receptor for monomeric IgG (Fc gamma R-1 or CD64). *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;170:582-8.

Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:23-8.

Chapgier A, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Vogt G, Feinberg J, Prochnicka-Chalufour A, et al. Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet*. 2006;18:2.

Condino-Neto A, Whitney C, Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. *J Immunol*. 1998;161:4960-7.

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 Biochem Biophys*. 1998;360:158-64.

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*. 2000;95:3548-54.

Chanock SJ, Barrett DM, Curnutte JT, Orkin SH. Gene structure of the cytosolic component phox-47 and mutations in autosomal recessive chronic granulomatous disease [abstract]. *Blood*. 1991;78:165.

Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*. 1994;269:24519-22.

- Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, et al. A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest*. 2003;112:1108-15.
- Curnutte JT. Conventional versus interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *J Infect Dis*. 1993;167:S8-12.
- D'acquistio F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv*. 2002;2:22-35.
- Damatta RA, Seabra SH, Manhães L, De Souza W. Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages. *Parasitol Res*. 2000;86:239-43.
- de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman P J, et al. Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*. 1998;280:1435-8.
- de Boer M, de Klein A, Hossle JP, Seger R, Corbeel L, Weening RS, Roos D. Cytochrome b558-negative, autosomal recessive chronic granulomatous disease: two new mutations in the cytochrome b558 light chain of the NADPH oxidase (p22-phox). *Am J Hum Genet*. 1992;51:1127-35.
- de Boer T, van Dissel JT, Kuijpers TW, Rimmelzwaan GF, Kroon FP, Ottenhoff TH. Influenza virus vaccination induces interleukin-12/23 receptor beta 1 (IL-12/23R beta 1)-independent production of gamma interferon (IFN-gamma) and humoral immunity in patients with genetic deficiencies in IL-12/23R beta 1 or IFN-gamma receptor I. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:1171-5.
- Didonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF κ B. *Nature*. 1997;388:548-54.
- Diebold BA, Bokoch GM. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol*. 2001;2:211-15.
- Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science*. 1994;265:531-3.
- Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GAP, Curnutte JT, ORKIN SH. 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*. 1990;86:1729-37.
- Ding AH, Nathan CF. The measurement of cytochrome b559 in polymorphonuclear leukocytes and macrophages in the presence of hemoglobin or mitochondrial cytochromes. *Anal Biochem*. 1988;175:22-9.

Döffinger R, Jouanguy E, Dupuis S, Fondanèche MC, Stéphan JL, Emile JF, et al. Partial interferon gamma receptor signalling chain deficiency in a patient with bacille Calmette-Guérin and Mycobacterium abscessus infection. *J Infect Dis.* 2000;181:379-84.

Döffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C, Kenwrick S, Dupuis-Girod S, Blanche S, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- κ B signaling. *Nat Genet.* 2001;27:277-85.

Donaldson M, Antignani A, Milner J, Zhu N, Wood A, Cardwell-Miller L, Changpairoa CM, Jackson SH. p47(phox)-deficient immune microenvironment signals dysregulate naive T-cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 2008;19. (Epub ahead of print)

Dorman SE, Holland SM. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest.* 1998;101:2364-9.

Dorman SE, Holland SM. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11:321-33.

Dupuis-Girod S, Corradini N, Hadj-Rabia S, Fournet JC, Faivre L, Le Deist F, Durand P, Döffinger R, Smahi A, Courtois G, et al. Osteopetrosis, lymphedema, anhidrotic ectodermal dysplasia, and immunodeficiency in a boy and incontinentia pigmenti in his mother. *Pediatrics.* 2002;109:97.

Dupuis-Girod S, Cancrini C, Le Deist F, et al. Successful allogeneic hemopoietic stem cell transplantation in a child who had anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Pediatrics.* 2006;118:e205-11.

Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, et al. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science.* 2001;293:300-3.

Dusi S, Nadalini KA, Donini M, Zentilin L, Wientjes FB, Roos D, Giacca M, Rossi F. Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly and activation in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines of normal and chronic granulomatous disease patients. *J Immunol.* 1998;161:4968-74.

D'Souza S, Levin M, Faith A, Yssel H, Bennett B, Lake RA, Brown IN, Lamb JR. Defective antigen processing associated with familial disseminated mycobacteriosis. *Clin Exp Immunol.* 1996;103:35-9.

Eklund EA, Skalnik DG. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J Biol Chem.* 1995;270:8267-73.

Eklund EA, Luo W, Skalnik DG. Characterization of three promoter elements and cognate DNA binding protein(s) necessary for IFN-gamma induction of gp91-phox transcription. *J Immunol.* 1996;157:2418-29.

Eklund EA, Jalava A, Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91phox expression. *J Biol Chem.* 1998;273:13957-65.

Eklund EA, Kakar R. Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67phox and gp91phox expression. *J Immunol.* 1999;163:6095-6105.

Eklund EA, Jalava A, Kakar R, Skalnik DG. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J Biol Chem.* 2000;270:8267-73.

Eklund EA, Jalava A, Kakar R. Tyrosine Phosphorylation of HoxA10 Decreases DNA Binding and Transcriptional Repression during Interferon- γ -induced Differentiation of Myeloid Leukemia Cell Lines. *J Biol Chem.* 2000;275:20117-26.

Ellson CD, Davidson K, Ferguson GJ, O'Connor R, Stephens LR, Hawkins PT. Neutrophils from p40phox^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J Exp Med.* 2006;203:1927-37.

Errante PR, Frazão JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2008;3:225-30.

Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breiman A, et al. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med.* 2003;197:527-35.

Fieschi C, Bosticardo M, de Beaucoudrey L, Boisson-Dupuis S, Feinberg J, Santos OF, et al. A novel form of complete IL-12/IL-23 receptor beta1 deficiency with cell surface-expressed nonfunctional receptors. *Blood.* 2004;104:2095-101.

Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, Vinolo E, Ku CL, Puel A, et al. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in the NEMO leucine zipper domain that impair CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med.* 2006a;203:1745-59.

Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, Jouanguy E, Boisson-Dupuis S, Fieschi C, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of IL-12/23- and IFN- γ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Sem Immu.* 2006b;18:347-61.

Frix CD III, Bronson DM. Acute miliary tuberculosis in a child with anhidrotic ectodermal dysplasia. *Pediatr Dermatol.* 1986;3:464-67.

Fujita T, Nolan GP, Ghosh S, Baltimore D. Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF κ B. *Genes Dev.* 1992;6:775-87.

Fusco F, Pescatore A, Bal E, Ghouli A, Paciolla M, Lioi MB, D'Urso M, Rabia SH, Bodemer C, Bonnefont JP, Munnich A, Miano MG, Smahi A, Ursini MV. Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations. *Hum Mutat.* 2008;29:595-604.

Gabriela G, Loots GG, Ovcharenko I. rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:W217-21.

Gauss KA, Bunger PL, Quinn MT. AP-1 is essential for p67(phox) promoter activity. *J Leukoc Biol.* 2002;71:163-72.

Gauss KA, Bunger PL, Larson TC, Young CJ, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Quinn MT. Identification of a novel tumor necrosis factor α -responsive region in the NCF2 promoter. *J Leukoc Biol.* 2005;77:267-78.

Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, et al. Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol.* 2007;82:729-41.

Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:776-94.

Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:2927-32.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.

Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:837-48.

Gaiomis J, Lombard Y, Fonteneau P, Muller CD, Levy R, Makaya-Kumba M, Lazdins J, Poindron P. Both mannose and beta glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages. *J Leuko Biol.* 1993;54:564-71.

Grandvaux N, Soucy-Faulkner A, Fink K. Innate host defense: Nox and Duox on phox's tail. *Biochimie.* 2007;89:1113-22.

Gray GR, Stamatoyannopoulos G, Naiman SC, Kliman MR, Klebanoff SJ, Austin T, Yoshida A, Robinson GC. Neutrophil dysfunction, chronic granulomatous disease, and non-spherocytic haemolytic anaemia caused by complete deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Lancet*. 1973;2:530-4.

Guia S, Cagnet C, de Beaucoudrey L, Tessmer MS, Jouanguy E, Berger C, Filipe-Santos O, Feinberg J, Camcioglu Y, Levy J, Al Jumaah S, Al-Hajjar S, Stephan JL, Fieschi C, Abel L, Brossay L, Casanova JL, Vivier E. A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo. *Blood*. 2008;111:5008-16.

Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucl Acids Res*. 2005;33:D514-7.

Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006;357:re13.

Haskill S, Beg AA, Tompkins SM, Morris JS, Yurochko AD, Sampson-Johannes A, Mondal K, Ralph P, Baldwin JR AS. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I κ B-like activity. *Cell*. 1991;65:1281-89.

Held KS, Glass WG, Orlovsky YI, Shamberger KA, Petley TD, Branigan PJ, Carton JM, Beck HS, Cunningham MR, Benson JM, Lane TE. Generation of a protective T-cell response following coronavirus infection of the central nervous system is not dependent on IL-12/23 signaling. *Viral Immunol*. 2008;21:173-88.

Henderson LM, Chappell JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta Bio-Energetics*. 1996;1273:87-107.

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:578-84.

Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*. 2006;25:6706-16.

Holmes B, Page AR, Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest*. 1967;46:1422-32.

Hossle JP, de Boer M, Seger RA, Roos D. Identification of allele-specific p22-phox mutations in a compound heterozygous patient with chronic granulomatous disease by mismatch PCR and restriction enzyme analysis. *Hum Genet*. 1994;93:437-42.

Inoue J, Kerr LD, Kakizuka A, Verma IM. I κ B gamma, a 70-kD protein identical to the C-terminal half of p110 NF- κ B - a new member of the I κ B family. *Cell*. 1992;68:1109-20.

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*. 2001;98:436-41.

Izakovicova Holla L, Kaňková K, Znojil V. Haplotype Analysis of the NADPH Oxidase p22-phox Gene in Patients with Bronchial Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;148:73-80.

Jain A, Ma CA, Liu S, Brown M, Cohen J, Strober W. Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. *Nat Immunol*. 2001;2:223-8.

Jesaitis AJ, Buescher ES, Harrison D. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J Clin Invest*. 1990;85:821-35.

Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacilli Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med*. 1996;335:1956-61.

Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, et al. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guérin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest*. 1997;100:2658-64.

Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondaneche MC, Dupuis S, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet*. 1999;21:370-8.

Jouanguy E, Dupuis S, Pallier A, Döffinger R, Fondanèche MC, Lamhamedi-Cherradi S, et al. In a novel form of complete IFN- γ R1 deficiency, cell-surface receptors fail to bind IFN- γ . *J Clin Invest*. 2000;105:1429-36.

Kautz B, Kakar R, Ebenezer D, Eklund AE. SHP1 Protein-tyrosine Phosphatase Inhibits gp91PHOX and p67PHOX Expression by Inhibiting Interaction of PU.1, IRF1, Interferon Consensus Sequence-binding Protein, and CREB-binding Protein with Homologous Cis Elements in the *CYBB* and *NCF2*. *J Biol Chem*. 2001;276:37868-78.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006;13:816-25.

Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:670-5.

Kim S, La Motte-Mohs RN, Rudolph D, Zuniga-Pflucker JC, Mak TW. The role of nuclear factor-kappaB essential modulator (NEMO) in B cell development and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003a;100:1203-8.

Kim JS, Kwon HY, Choi WH, Jeon CY, Kim JI, Kim J, Lee JY, Kim YS, Park JB. Phagocytosis of serum- and IgGopsonized zymosan particles induces apoptosis through superoxide but not nitric oxide in macrophage J774A.1. *Exp Mol Med.* 2003b;35:211-21.

Kjeldsen L, Bainton DF, 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.* 1993;82:3183-91.

Koscielniak E, de Boer T, Dupuis S, Naumann L, Casanova JL, Ottenhoff TH. Disseminated Mycobacterium peregrinum infection in a child with complete interferon-gamma receptor-1 deficiency. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:378-80.

Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C. Different mechanisms control si0gnal-induced degradation and basal turnover of the NFκB inhibitor IκB in vivo. *EMBO J.* 1996;15:6716-26.

Kuwano Y, Tominaga K, Kawahara T, Sasaki H, Takeo K, Nishida K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S, Rokutan K. Tumor necrosis factor α activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:1642-52.

Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:319-31.

Landing BH, Shirkey HS. A syndrome of recurrent infection and infiltration of the viscera by pigmented lipid histiocytes. *Pediatrics.* 1957;20:431-42.

Lau YL, Chan GC, Ha SY, Hui YF, Yuen KY. The role of phagocytic respiratory burst in host defense against Mycobacterium tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 1998;26:226-7.

Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and mycobacterium kansasii by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immunity* 2000;68:4736-44.

Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JM, Nauseef WM, Clark RA, Gallin JI, Malech HL. Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science*. 1990;248:727-30.

Levin M, Newport MJ, D'Souza S, Kalabalikis P, Brown IN, Lenicker HM, et al. Familial disseminated atypical mycobacterial infection in childhood: a human mycobacterial susceptibility gene? *Lancet*. 1995;345:79-83.

Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ, Shah AM. Essential Role of the NADPH Oxidase subunit p47phox in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- α . *Circ Res*. 2002a;90:143-50.

Li SL, Valente AJ, Zhao SJ, Clark RA. PU.1 is essential for p47(phox) promoter activity in myeloid cells. *J Biol Chem*. 1997;272:17802-9.

Li SL, Schlegel W, Valente AJ, Clark RA. Critical flanking sequences of PU.1 binding sites in myeloid-specific promoters. *J Biol Chem*. 1999;274:32453-60.

Li SL, Valente AJ, Wang L, Gamez MJ, Clark RA. Transcriptional regulation of the p67phox gene: role of AP-1 in concert with myeloid-specific transcription factors. *J Biol Chem*. 2001;276:39368-78.

Li SL, Valente AJ, Qiang M, Schlegel W, Gamez M, Clark RA. Multiple PU.1 sites cooperate in the regulation of p40phox transcription during granulocytic differentiation of myeloid cells. *Blood*. 2002b;99:4578-87.

Lindsey S, Zhu C, Lu YF, Eklund EA. HoxA10 represses transcription of the gene encoding p67phox in phagocytic cells. *J Immunol*. 2005;175:5269-79.

Löfgren R, Serrander L, Forsberg M, Wisson Å, Wasteson Å, Stendahl O. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1452:46-59.

Luengo-Blanco M, Prando C, Bustamante J, Aragão-Filho WC, Pereira PVS, Rehder J, Padden C, Casanova JL, Newburger PE, Condino-Neto A. Essential role of nuclear factor- κ B for NADPH oxidase activity in normal and anhidrotic ectodermal dysplasia leukocytes. *Blood*. 2008;112:1453-60.

Luo W, Skalnik DG. CCAAT displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91phox promoter. *J Biol Chem*. 1996;30:18203-10.

MacLennan C, Fieschi C, Lammas DA, Picard C, Dorman SE, Sanal O, et al. Interleukin (IL)-12 and IL-23 are key cytokines for immunity against *Salmonella* in humans. *J Infect Dis*. 2004;190:1755-7.

Marden CM, Stefanidis D, Cunninghame-Graham DS, Casimir CM. Differentiation-dependent up-regulation of p47(phox) gene transcription is associated with changes in PU.1 phosphorylation and increased binding affinity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:193-202.

McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endoc Rev.* 1999;4:435-59.

Matute, JD, Arias AA, Dinauer MC, Patiño PJ. p40phox: The last NADPH oxidase subunit. *Blood Cell Mol Dis.* 2005;35:291-302.

Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. IKK-1 and IKK-2: cytokine activated I κ B kinase essential for NF κ B activation. *Science.* 1997;278:860-6.

Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T, Thanos D. Recruitment of CBP/p300 by the IFN- β enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell.* 1998;1:277-87.

Mimouni J. Our experiences in three years of BCG vaccination at the center of the O.P.H.S. at Constantine; study of observed cases (25 cases of complications from BCG vaccination). *Alger Med.* 1951;55:1138-47.

Moore PA, Ruben SM, Rosen CA. Conservation of transcriptional activation functions of the NF κ B p50 and p65 subunits in mammalian cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1993;13:1666-74.

Moreno MU, San Jose G, Orbe J, Paramo JA, Beloqui O, Diez J, Zalba G. Preliminary characterisation of the promoter of the human p22(phox) gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Lett.* 2003;542:27-31.

Movahedi M, Aghamohammadi A, Rezaei N, et al. Chronic granulomatous disease: a clinical survey of 41 patients from the Iranian primary immunodeficiency registry. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;134:253-9.

Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci.* 2005;118:4589-92.

Nakai T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1990;189:347-53.

Nauseef WM. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol.* 2004;122:277-91.

Neufeld EJ, Skalnik DG, Lievens PM, Orkin SH. Human CCAAT displacement protein is homologous to the *Drosophila* homeoprotein. *Nat Genet.* 1992;1:50-5.

Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* 1996;335:1941-9.

Ni W, Zhan Y, He H, Maynard E, Balschi JA, Oettgen P. Ets-1 is a critical transcriptional regulator of reactive oxygen species and p47(phox) gene expression in response to angiotensin II. *Circ Res.* 2007;101:985-94.

Nishikomori R, Akutagawa H, Maruyama K, et al. X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival. *Blood.* 2004;103:4565-72.

Nóbrega MA, Ovcharenko I, Afzal V, et al. Scanning human gene deserts for long-range enhancers. *Science.* 2003;302:413.

Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HI. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct cytosol factors. *Science.* 1988;242:1298-1301.

Ochs HD, Igo RP. The NBT slide test: a simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers. *J Pediatr.* 1973;83:77-82.

O'Neill LA, Dinarello CA. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today.* 2000;21:206-9.

Orange JS, Brodeur SR, Jain A, Bonilla FA, Schneider LC, Kretschmer R, Nurko S, Rasmussen WL, Kohler JR, Gellis SE, et al. Deficient natural killer cell cytotoxicity in patients with IKK-g/NEMO mutations. *J Clin Invest.* 2002;109:501-9.

Ouaaz F, Li M, Beg AA. A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappaB in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death. *J Exp Med.* 1999;189:999-1004.

Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:W280-6.

Ovcharenko I, Stubbs L, Loots GG. Interpreting mammalian evolution using Fugu genome comparisons. *Genomics.* 2004;84:890-5.

Ovcharenko I, Loots GG, Giardine BM, et al. Mulan: Multiple-sequence local alignment and visualization for studying function and evolution. *Genome Res.* 2005;15:184-94.

Ozenci V, Pashenkov M, Kouwenhoven M, Rinaldi L, Söderström M, Link H. IL-12/IL-12R system in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2001;114:242-52.

Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. Angiotensin II Induces p67phox mRNA Expression and NADPH Oxidase Superoxide Generation in Rabbit Aortic Adventitial Fibroblasts. *Hypertension.* 1998;32:331-7.

Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol.* 2002;168:5699-708.

Park JB. Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med.* 2003;35:325-35.

Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest.* 1987;80:732-42.

Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:3319-23.

Pennington KN, Taylor JA, Bren GD, Paya CV. IkappaB kinase-dependent chronic activation of NF-kappaB is necessary for p21(WAF1/Cip1) inhibition of differentiation-induced apoptosis of monocytes. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1930-41.

Picard C, Fieschi C, Altare F, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Feinberg J, et al. Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet.* 2002;70:336-48.

Pierre-Audigier C, Jouanguy E, Lamhamedi S, Altare F, Raugier J, Vincent V, Canioni D, Emile J-F, Fischer A, Blanche S, Gaillard JL, Casanova JL. Fatal disseminated Mycobacterium smegmatis infection in a child with inherited interferon gamma receptor deficiency. *Clin Infect Dis.* 1997;24:982-4.

Porter CD, Parkar MH, Kinnon C. Identification of a donor splice site mutation leading to loss of p22-phox exon 5 in autosomal chronic granulomatous disease. *Hum Mutat.* 1996;7:374.

Prando CCM. O papel crucial do eixo IL-12/23-IFN γ para o desenvolvimento e ativação do sistema NADPH oxidase humano. [Tese

(Doutorado em Farmacologia)]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2008.

Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14002-7.

Puel A, Picard C, Ku CL, Smahi A, Casanova JL. Inherited disorders of NF-kappaB-mediated immunity in man. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:34-41.

Puel A, Reichenbach J, Bustamante J, et al. The NEMO mutation creating the most-upstream premature stop codon is hypomorphic because of a reinitiation of translation. *Am J Hum Genet*. 2006;78:691-701.

Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest*. 1967;46:668-79.

Raad H, Pacllet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidallo MA, Dang PM, El-Benna J. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J*. 2008. [Epub ahead of print].

Rae J, Newburger PE, Dinauer MC, et al. X-Linked chronic granulomatous disease: Mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *Am J Hum Genet*. 1998;62:1320-31.

Ravetch JV. Fc receptor. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:121-5.

Repine JE, Rao G, Beall GD, White JG. Inhibition of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation in vitro by nitroblue tetrazolium and vitamin E. *Am J Pathol*. 1978;90:659-74.

Repine JE, Rasmussen B, White JG. An improved nitroblue tetrazolium test using phorbol myristate acetate-coated coverslips. *Am J Clin Pathol*. 1979;71:582-5.

Rice NR, Mackichan ML, Israel A. The precursor of NFκB p50 has IκB-like functions. *Cell*. 1992;71:243-53.

Roesler J, Hecht M, Freihorst J, Lohmann-Matthes ML, EMMENDORFFER A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. *Eur J Pediatr*. 1991;150:161-5.

Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev*. 2005;203:38-47.

Ross GD, Cain JA, Lachmann PJ. Membrane complement receptor type 3 (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin and functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol.* 1985;134:3307-14.

Roos D, van Zwieten R, Wijnen JT, Gomez-Gallego F, de Boer M, Stevens D, Pronk-Admiraal CJ, de Rijk T, van Noorden CJ, Weening RS, Vulliamy TJ, Ploem JE, Mason PJ, Bautista JM, Khan PM, Beutler E. Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase Volendam, leading to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood.* 1999; 94:2955-62.

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP. Cloning the gene inherited disorder - chronic granulomatous disease, on the basis of its chromosomal. *Nature.* 1986;322:32-8.

Sadikot RT, Zeng H, Yull FE, Li B, Cheng DS, Kernodle DS, Jansen ED, Contag CH, Segal BH, Holland SM, Blackwell TS, Christman JW. p47phox deficiency impairs NF- κ B activation and host defense in *Peudomonas pneumonia*. *J Immunol.* 2004;172:1801-8.

Santagati F, Abe K, Schmidt V, et al. Identification of Cis-regulatory elements in the mouse Pax9/Nkx2-9 genomic region: implication for evolutionary conserved synteny. *Genetics.* 2003;165:235-42.

Schapiro BL, Newburger PE, Klempner MS, Dinauer MC. Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *N Engl J Med.* 1991;325:1786-90.

Segal AW. The molecular and cellular pathology of chronic granulomatous disease. *Eur J Clin Invest.* 1988;18:433-43.

Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci.* 1993;18:43-7.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986;46:706-16.

Serrander L, Larsson J, Lundquist H, Lindmark M, Fallman M, Dahgren C, Stendahl O. Particles binding b2-integrins mediate intracellular production of oxidative metabolites in human neutrophils independently of phagocytosis. *Biochi Biophys Acta.* 1999;1452:133-44.

Shimizu H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, O'malley BW. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res.* 1997;52:141-64.

Siebenlist U, Brown K, Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear-kb. *Nature reviews. Immunology.* 2005;5:435-45.

Skalnik DG, Strauss EC, Orkin SH. CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J Biol Chem.* 1991;266:16736-44.

Skalnik DG, Dorfman DM, Perkins AS, et al. Targeting of transgene expression to monocyte/macrophages by the gp91-phox promoter and consequent histiocytic malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:8505-9.

Skalnik DG. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. *Gene.* 2002;284:1-21.

Smith CL, Onate SA, Tsai MJ, O'malley BW. CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:8884-8.

Someya A, Nagaoka I, Nuno H, Yamashita T. Translocation of guinea pig p40-phox during activation of NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1277:217-25.

Spitz F, Gonzalez F, Duboule D. A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell.* 2003;113:405-17.

Stein B, Yang MX. Repression of interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . *Mol Cell Biol.* 1995;15:4971-9.

Stuehr DJ, Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ . *J Immunol.* 1987;139:518-25.

Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: A key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001;107:7-11.

Tamura M, Shiozaki I, Ono S, Miyano K, Kunihiro S, Sasaki T. p40phox as an alternative organizer to p47phox in Nox2 activation: A new mechanism involving an interaction with p22phox. *FEBS Lett.* 2007;581:4533-8.

Thomas V, Samanta S, Wu C, Berliner N, Fikrig E. *Anaplasma phagocytophilum* modulates gp91phox gene expression through altered interferon regulatory factor 1 and PU.1 levels and binding of CCAAT displacement protein. *Infect Immun.* 2005;73:208-18.

Thomas V, Samanta S, Fikrig E. *Anaplasma phagocytophilum* increases cathepsin L activity, thereby globally influencing neutrophil function. *Infect Immun.* 2008;76:4905-12.

Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA. proteasome inhibitor prevents activation of NF κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B that is still bound to NF κ B. *EMBO J.* 1994;13:5433-41.

Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T. A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199:1378-87.

Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H. Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox. *J Exp Med.* 1996;184:893-902.

Tsunawaki S, Yoshikawa K. Relationships of p40(phox) with p67(phox) in the activation and expression of the human respiratory burst NADPH oxidase. *J Biochem (Tokyo).* 2000;128:777-83.

Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2008;266:37-52.

Verbeek W, Lekstrom-Himes J, Park DJ, Dang PMC, Vuong PT, Kawano S, Babior BM, Xanthopoulos K, Koeffler HP. Myeloid transcription factor C/EBP ϵ is involved in the positive regulation of lactoferrin gene expression in neutrophils. *Blood.* 1999;94:3141-50.

Venkatesh B, Gilligan P, Brenner S. Fugu: a compact vertebrate reference genome. *FEBS Lett.* 2000;476:3-7.

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Miyamoto S. Rel/NF κ B I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 1995;9:2723-35.

Verma IM, Stevenson J. I κ B kinase: beginning, not the end. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1997;94:11758-60.

Vogt G, Chapgier A, Yang K, Chuzhanova N, Feinberg J, Fieschi C, et al. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet.* 2005;37:692-700.

Volkman DJ, Buescher ES, Gallin JI, Fauci AS. B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: superoxide generation in chronic granulomatous disease and granules in Chediak-Higashi syndrome. *J Immunol.* 1984;133:3006-9.

Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science.* 1988;242:1295-7.

Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT, Thomas GR. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke*. 1997;28:2252-8.

Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 alpha-dependent NF-kappa B activity. *J Exp Med*. 2005;201:105-15.

Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J*. 1993;296:557-61.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin JR AS. NF-kB Antiapoptosis: induction of TRAF-1 and TRAF-2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998;281:1680-3.

Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, Levine JE, Petryniak B, Derrow CW, Harris C, Jia B, Zheng Y, Ambruso DR, Lowe JB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Boxer L. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood*. 2000;96:1646-54.

Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB JR, Boyle J, Curnutte J, Gallin J I, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79:155-69.

Wolfort RM, Stokes KY, Granger DN. Immune cell-mediated endothelial cell dysfunction during hypercholesterolemia involves interferon-dependent signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H2219.

Woodman RC, Newburger PE, Anklesaria P, Erickson RW, Rae J, Cohen MS, Curnutte JT. A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells. *Blood*. 1995;85:231-41.

Yamamoto M, Takeda K. Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses. *J Infect Chemother*. 2008;14:265-9.

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116:1310-6.

Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol*. 2008;82:12312-24.

Zhan S, Vazquez N, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, Green ED, Chanock SJ. 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*. 1996;88:2714-21.

Zhong H, Suyang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*. 1997;89:413-24.

Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, Shapira SK, Farndon PA, Wara DW, Emmal SA, et al. A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-g (NEMO). *Am J Hum Genet*. 2000;67:1555-62.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)