

**JOSIAS BRITO FRAZÃO**

**EFEITO DO INTERFERON-GAMA SOBRE  
DEFEITOS DE “SPLICING” QUE LEVAM À  
DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA LIGADA  
AO CROMOSSOMO X**

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.

**JOSIAS BRITO FRAZÃO**

**EFEITO DO INTERFERON-GAMA SOBRE DEFEITOS DE “SPLICING” QUE  
LEVAM À DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA LIGADA AO  
CROMOSSOMO X**

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. Antônio 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 não autorizada pelo autor

Frazão, Josias Brito.

Efeito do interferon-gamma sobre defeitos de "splicing" que levam à doença granulomatosa crônica ligada ao cromossomo X / Josias Brito Frazão. -- 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: Imunologia aplicada.

Versão do título para o inglês: Interferon-gamma effect on splicing defects that cause chronic granulomatous disease linked to X chromosome.

Descritores: 1. Doença granulomatosa crônica 2. "Splicing" 3. IFN-gama 4. Ligado ao X 5. Doenças imunológicas 6. Interferons I. Condino-Neto, Antonio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB228/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Ciências Biomédicas

---

Candidato: Josias Brito Frazão

Título da Dissertação: Efeito do interferon-gama sobre defeitos de “splicing” que levam à doença granulomatosa crônica ligada ao cromossomo X

Orientador: Antônio Condino Neto

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

( ) **Aprovado**      ( ) **Reprovado**

**Examinador(a)** Assinatura .....

Nome: .....

Instituição: .....

**Examinador(a)** Assinatura .....

Nome: .....

Instituição: .....

**Presidente(a)** Assinatura .....

Nome: .....

Instituição: .....

Dedico este trabalho...

...Ao meu pai, Edson, que sempre foi e será modelo de dedicação, profissionalismo e honestidade. Por todo seu amor dedicado à nossa família, obrigado pelo apoio e incentivo constantes para a realização dos meus sonhos.

...À minha mãe, Stella, por todo seu amor infinito, incentivo e compreensão. Muito obrigado por me ensinar a lutar pelos meus sonhos, me mostrando que vale a pena transpor obstáculos para conquistá-los.

...Aos meus avós, que foram sempre alicerce para todas as conquistas.

...Aos meus tios, tias, primos e primas que sempre me deram apoio, carinho e sempre estiveram presentes ao longo desta caminhada.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha querida namorada, Anna Karolina...

...pelo seu amor e compreensão ao me perdoar pelos meus pecados de ausência, compartilhando com dedicação e paciência o final desta etapa importante da minha vida...

...pelo conforto e carinho nos momentos de angústia e que tanto me fazem bem...

...pela sua companhia que me completa e me presenteia com os momentos mais alegres da minha vida...

...pela sua cumplicidade e parceria em sonhos e realizações.

Sua companhia me deu forças nos momentos difíceis e sempre me motivaram a continuar, ajudando no meu amadurecimento pessoal e profissional.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Antonio Condino Neto, pela orientação, amizade, apoio, confiança na minha capacidade profissional, oportunidade e incentivo que possibilitou a realização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Beatriz Costa Carvalho, pela atenção, contribuição disponibilizando o material dos seus pacientes, e pelas suas valiosas sugestões dadas no sentido de melhorar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade, que me propiciou a possibilidade de grande conhecimento e crescimento profissional permitindo que parte deste trabalho fosse desenvolvida em seu laboratório na UNIFESP, e que junto com todos os seus alunos e funcionários, principalmente à Silvia Helena e Theresa, que me fizeram sentir à vontade todas as vezes que lá estive. Muito obrigado pela colaboração na análise e confecção deste trabalho, como também na minha formação como pesquisador.

À Universidade de São Paulo pelo apoio institucional, ao investir no meu aperfeiçoamento e à FAPESP pela Bolsa de Mestrado e Auxílio concedido a este trabalho (processo nº 06/51005-9).

Aos amigos de hoje e sempre...

...Christina Kubo, Rosana Rezende e Silvana Lucchinni, pela atenção, amizade constante, ajuda, carinho sempre presentes, e por todos os ensinamentos técnicos e pessoais possíveis e imagináveis.

...Paulo Vitor e Walmir, amigos desde faculdade cuja amizade e companheirismo estarão sempre ao meu lado.

... Patrícia Macchiaverni, Julieta Genre e Rafael Larocca, cuja companhia pude contar da mesma forma nos momentos de dificuldade, quanto nos de alegria. O alto-astral e brincadeiras de vocês sempre alegram todos ao redor.

...Otávio, Paolo, Dora e Stefanie, amigos sempre dispostos a auxiliar e por todos os momentos de convívio e paciência.



...todos do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação em Pediatria de Campinas, principalmente Edgar Borges (Ed-boy) por todo auxílio na realização deste trabalho, Carolina Prando (Cacá) pelo seu apoio intelectual, Jussara Redher (Jú) pelo seu apoio técnico, Luis Alberto Pedroza (Mateo), Carolina Almeida (Carú), Marília Kanegae, Juliana Moreira, Maiara e Fabiana pela companhia, apoio técnico, brincadeiras, viagens compartilhadas e todos os ensinamentos diários fundamentais para a realização deste trabalho.

À todas as “meninas do Laboratório de Imunologia de Mucosas” que nos acolheram de forma tão carinhosa. Muito obrigado por todos os tipos de auxílio e pela grande amizade construída.

À Dr<sup>a</sup>. Patrícia Palmeira, pelos auxílios teóricos, pelo incentivo, descontração, pelas discussões de idéias e suporte para realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel, pela eterna amizade, por quem guardo grande admiração e a quem devo meu início e continuação nesta caminhada cansativa e corrida, mas maravilhosa e cheia de boas surpresas que é a pesquisa.

Aos amigos do LIF, por quem guardo eterno carinho, estima e muita saudade.

Aos companheiros pós-graduandos de todos os andares e laboratórios, pelo apoio, auxílio e amizade construída.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Imunologia: Jotelma, Amarildo e Enir, pelo desempenho e dedicação em todos os momentos em que precisei.

Aos grandes e eternos amigos por todos os momentos (apesar de cada vez mais raros).

Aos pacientes que tornaram possível este estudo.

E a todos, aqui não citados, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Acalma-te, pois é com calma que  
encontrarás as respostas para tudo  
o que duvidas e perguntas.

## RESUMO

Frazão JB. Efeito do interferon-gama sobre defeitos de “splicing” que levam à doença granulomatosa crônica ligada ao cromossomo X [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Os fagócitos contêm uma nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase associada à membrana plasmática, que gera superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio, os quais apresentam atividade microbicida, tumoricida e inflamatória. Defeitos na NADPH oxidase resultam na doença granulomatosa crônica (DGC), cujo quadro clínico caracteriza-se pela presença de infecções recorrentes graves e granulomas. Mutações próximas aos sítios de “splicing” que interferem com o processamento do RNA mensageiro, acarretando deleção de um ou mais exons, são descritos cada vez mais na literatura científica. Nesses casos, os mecanismos moleculares que levam à DGC nem sempre são totalmente esclarecidos, assim como o efeito do IFN- $\gamma$ , seja sobre o processamento da mensagem ou estabilidade dos transcritos. Portanto, a análise dos mecanismos moleculares que regulam a expressão e função deste sistema é de grande importância para a compreensão da fisiologia das células fagocíticas e de sua atividade microbicida. Com base nessas informações o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito do IFN- $\gamma$  sobre os eventos pré- e pós-transcricionais relativos à expressão do gene *CYBB* que codifica o componente gp91-*phox* em pacientes com DGC ligada ao X, ocasionada por defeitos de “splicing”, examinando a atividade do sistema NADPH oxidase medindo a liberação de superóxido antes e após o tratamento com IFN- $\gamma$ ; analisar a expressão de transcritos do gene *CYBB* em pacientes com defeito de “splicing” ou com substituição “nonsense”, antes e após o tratamento com IFN- $\gamma$ , e o efeito do IFN- $\gamma$  sobre as proteínas que compõem o spliceossoma. O estudo da função do sistema NADPH oxidase demonstraram importante déficit na liberação de ânion superóxido após estímulo com PMA nas células dos pacientes com DGC por defeito de “splicing” no gene *CYBB*, com melhora de resposta após estímulo com IFN- $\gamma$ . No grupo controle houve uma melhora na produção de ânion superóxido tanto no grupo não estimulado com PMA (PMN sem IFN- $\gamma$ : 1,32 PMN com IFN- $\gamma$ : 2,05 - mononuclear sem IFN- $\gamma$ : 2,2 mononuclear com IFN- $\gamma$ : 6,6 nmol/10<sup>6</sup>/hora) quanto no grupo estimulado (PMN sem IFN- $\gamma$ : 9,5 PMN com IFN- $\gamma$ : 8,9 - mononuclear sem IFN- $\gamma$ : 0,0 mononuclear com IFN- $\gamma$ : 8,2 nmol/10<sup>6</sup>/hora). No

paciente VG houve uma melhora na produção de ânion superóxido tanto no grupo não estimulado com PMA (PMN sem IFN- $\gamma$ : 0,75 PMN com IFN- $\gamma$ : 1,7 - mononuclear sem IFN- $\gamma$ : 0,0 mononuclear com IFN- $\gamma$ : 3,6 nmol/10<sup>6</sup>/hora) quanto no grupo estimulado (PMN sem IFN- $\gamma$ : 0,26 PMN com IFN- $\gamma$ : 0,7 - mononuclear sem IFN- $\gamma$ : 3,8 mononuclear com IFN- $\gamma$ : 4,9 nmol/10<sup>6</sup>/hora). Podemos constatar melhora na produção de anion superóxido após tratamento com IFN- $\gamma$  no grupo controle não estimulado (sem IFN- $\gamma$ : 0,96 com IFN- $\gamma$ : 1,01 nmol/10<sup>6</sup>/hora) e estimulado com PMA (sem IFN- $\gamma$ : 7,02 com IFN- $\gamma$ : 7,11 nmol/10<sup>6</sup>/hora), no paciente GCG estimulado com PMA (sem IFN- $\gamma$ : 1,09 com IFN- $\gamma$ : 1,16 nmol/10<sup>6</sup>/hora) e no paciente MF não estimulado com PMA (sem IFN- $\gamma$ : 0,55 com IFN- $\gamma$ : 1,01 nmol/10<sup>6</sup>/hora). Os ensaios de PCR pré e pós tratamento com IFN- $\gamma$  demonstraram diferenças no padrão de bandas dos produtos de amplificação da região compreendida entre os Exons 2-4 com os primers.entre controle e paciente MF (bandas maiores) e pacientes GCG e RVSS (bandas menores) devido às suas características moleculares particulares. Através da análise da expressão relativa constatamos que após o tratamento com IFN- $\gamma$  nota-se um aumento da expressão da *gp91-phox* tanto em indivíduos normais (sem IFN- $\gamma$  2,13, com IFN- $\gamma$  2,96) quanto nos pacientes com X-DGC ocasionada por defeitos de “splicing” (GCG: sem IFN- $\gamma$  0,44, com IFN- $\gamma$  4,15; RVSS: sem IFN- $\gamma$  0,54, com IFN- $\gamma$  4,11), e no paciente MF (sem IFN- $\gamma$  5,11, com IFN- $\gamma$  2,94) há redução desta expressão. Através do Real-time PCR foi possível notar uma expressão gênica diferenciada entre pacientes com DGC e controles sadios. Em células polimorfonucleares os níveis de expressão encontrados são maiores que os encontrados para células mononucleares, células Thp1 e linfócitos B-EBV. Em células polimorfonucleares, as células do controle (sem IFN- $\gamma$ : 1,01, com IFN- $\gamma$ : 35,99) e do paciente VG (sem IFN- $\gamma$ : 3,67, com IFN- $\gamma$ : 5,31) possuem expressão relativa aumentada quando são tratadas com IFN- $\gamma$ , sendo que no controle este aumento é maior que o encontrado no paciente VG. No paciente MF observou-se uma diminuição da expressão (sem IFN- $\gamma$ : 29,96, com IFN- $\gamma$ : 24,76). Em células mononucleares, o paciente VG (sem IFN- $\gamma$ : 0,73, com IFN- $\gamma$ : 1,2) e o paciente MF (sem IFN- $\gamma$ : 0,38, com IFN- $\gamma$ : 0,78) possuem expressão relativa aumentada quando são tratadas com IFN- $\gamma$ , sendo que os valores encontrados para o paciente VG são maiores que os encontrados no paciente MF. Nas células controle observou-se uma diminuição da expressão (sem IFN- $\gamma$ : 29,96, com IFN- $\gamma$ : 24,76). Em células Thp1 e em linfócitos B-EBV, pode-se notar que há um aumento da expressão do *CYBB* em todas as células utilizadas neste ensaio quando estas são tratadas com IFN- $\gamma$ . Níveis similares de expressão da *gp91-phox* são encontrados

em células Thp1 (sem IFN- $\gamma$ : 1,02, com IFN- $\gamma$ : 1,57), controle (sem IFN- $\gamma$ : 1,02, com IFN- $\gamma$ : 1,79), RVSS (sem IFN- $\gamma$ : 0,87, com IFN- $\gamma$ : 1,53) e MF (sem IFN- $\gamma$ : 0,13, com IFN- $\gamma$ : 1,47). O paciente GCG apresentou os menores níveis de expressão gênica (sem IFN- $\gamma$  0,19, com IFN- $\gamma$  2,2). Por meio de marcação de proteínas do spliceossoma foi possível visualizar um aumento da fluorescência além de modificações no padrão de coloração das células aderentes Hep-2 após o tratamento com IFN- $\gamma$ . Nas células Thp1, o tratamento com IFN- $\gamma$  também causou um aumento da marcação do antígeno, assim como o observado nas Hep-2. Em linfócitos B imortalizados de indivíduos sadios e de um paciente DGC com defeitos de “splicing” (IC) e um paciente DGC com substituição “nonsense” (MF) foi possível identificar alterações na marcação das proteínas do spliceossoma, mais evidentes com as proteínas Sm-RNPs. Para o paciente que apresenta substituição "nonsense" (MF) utilizado neste ensaio, os padrões de marcação negativos, SSA/Ro e Sm-RNP se mostraram iguais aos padrões encontrados no grupo controle. Estes resultados sugerem que o IFN- $\gamma$  possa influenciar a expressão gênica do *CYBB* por meio de eventos pré-transcricionais. Concluindo, o uso do IFN- $\gamma$ : aumenta a liberação de anion superóxido tanto de indivíduos sadios quanto nos pacientes estudados, sendo que este aumento da liberação de anion superóxido é maior em células polimorfonucleares; aumenta a expressão de transcritos do gene da *gp91-phox* tanto de indivíduos sadios quanto dos pacientes estudados; e age a nível pré-transcricional aumentando a quantidade de proteínas que participam no processo do “splicing”. Dessa forma, os resultados observados reforçam a importância do uso do IFN- $\gamma$  em pacientes com DGC que apresentam defeitos específicos de “splicing”.

**Palavras-chave:** Doença Granulomatosa Crônica ligado ao X. X-DGC. NADPH oxidase. “Splicing”. IFN- $\gamma$ . explosão oxidativa.

## ABSTRACT

Frazão JB. The effect of interferon-gamma on splicing defects leading to X-linked chronic granulomatous disease [Master Dissertation]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Phagocytes present a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) associated to the plasma membrane that generates superoxide and other oxygen reactive intermediates; playing microbicide, tumoricide, and inflammatory activities. Defects on the NADPH oxidase system leads to Chronic Granulomatous Disease (CGD), characterized by recurrent and severe infections and granuloma. Mutations close to splice sites that interfere with mRNA processing leading to deletion of one or more exons are commonly described in the scientific literature. In these cases, the molecular mechanisms causing CGD are not always totally clarified, as well as the effect of IFN- $\gamma$  on the mRNA processing or on transcripts stability. Having this together, the analysis of the molecular mechanisms that regulate the expression and function of this system is of great importance for the understanding phagocytic cells physiology and their microbicide activity. The aim of this work was to investigate the effect of IFN- $\gamma$  on pre- and post-transcriptional events related to *CYBB* gene expression, encoding the gp91-*phox* component in patients with X-linked CGD caused by splicing defects. We will examine the NADPH system activity measuring the superoxide release before and after IFN- $\gamma$  treatment, analyze *CYBB* transcripts expression on patients with splicing defects and with nonsense mutations before and after the IFN- $\gamma$  and the effect of IFN- $\gamma$  on spliceosome proteins. The study of the NADPH oxidase function demonstrates an impairment on superoxide release after PMA stimuli in cells from patients with CGD caused by splicing defects on *CYBB* gene, with an improvement on superoxide production after IFN- $\gamma$  stimuli. There was an increase of superoxide production on not stimulated with PMA control cells (PMN without IFN- $\gamma$ : 1,32; PMN with IFN- $\gamma$ : 2,05 – mononuclear cells without IFN- $\gamma$ : 2,2; mononuclear cells with IFN- $\gamma$ : 6,6 nmol/10<sup>6</sup>/hour) and on the PMA-stimulated control cells (PMN without IFN- $\gamma$ : 9,5; PMN with IFN- $\gamma$ : 8,9 - mononuclear cells without IFN- $\gamma$ : 0,0; mononuclear cells with IFN- $\gamma$ : 8,2 nmol/10<sup>6</sup>/hour). On cells of patient VG there was an improvement on superoxide production by non stimulated cells (PMN without IFN- $\gamma$ : 0,75; PMN with IFN- $\gamma$ : 1,7 - mononuclear cells without IFN- $\gamma$ : 0,0; mononuclear cells with IFN- $\gamma$ : 3,6 nmol/10<sup>6</sup>/hour) as well as on the PMA-stimulated cells (PMN without IFN- $\gamma$ : 0,26;

PMN with IFN- $\gamma$ : 0,7 – mononuclear cells without IFN- $\gamma$ : 3,8; mononuclear cells with IFN- $\gamma$ : 4,9 nmol/10<sup>6</sup>/hour). Improvement on superoxide production after IFN- $\gamma$  treatment on non stimulated control cells (without IFN- $\gamma$ : 0,96; with IFN- $\gamma$ : 1,01 nmol/10<sup>6</sup>/hour) and stimulated with PMA (without IFN- $\gamma$ : 7,02; with IFN- $\gamma$ : 7,11 nmol/10<sup>6</sup>/hour), on patient GCG stimulated with PMA (without IFN- $\gamma$ : 1,09; with IFN- $\gamma$ : 1,16 nmol/10<sup>6</sup>/hour) and on patient MF not stimulated with PMA (without IFN- $\gamma$ : 0,55; with IFN- $\gamma$ : 1,01 nmol/10<sup>6</sup>/hour) could be identified. Pre- and post-treatment with IFN- $\gamma$  PCR assays demonstrate differences on amplified products band pattern of region between Exons 2-4 between control and patient MF (higher bands) and patients GCG and RVSS (lower bands) because of its particular molecular characteristics. Relative expression analysis shows that after IFN- $\gamma$  treatment an increase on *gp91-phox* expression in normal individuals (without IFN- $\gamma$  2,13; with IFN- $\gamma$  2,96) and in patients with X-CGD caused by splicing defects (GCG: without IFN- $\gamma$  0,44, with IFN- $\gamma$  4,15; RVSS: without IFN- $\gamma$  0,54, with IFN- $\gamma$  4,11) is noted, and on patient MF (without IFN- $\gamma$  5,11, with IFN- $\gamma$  2,94) there is an reduction of this expression. Real-time PCR results indicate a differentiated gene expression between patients with CGD and healthy controls. In polymorfonuclear cells the expression levels found are higher than on those found for mononuclear cells, Thp1 cells and B-EBV lymphocytes. In polymorfonuclear cells, control cells (without IFN- $\gamma$ : 1,01, with IFN- $\gamma$ : 35,99) and on VG patient (without IFN- $\gamma$ : 3,67, with IFN- $\gamma$ : 5,31) there is an increase on relative expression when treated with IFN- $\gamma$ , on control this rise is higher than those found on patient VG. On patient MF an decrease of expression (without IFN- $\gamma$ : 29,96, with IFN- $\gamma$ : 24,76) was observed. On mononuclear cells, patient VG (without IFN- $\gamma$ : 0,73, with IFN- $\gamma$ : 1,2) and patient MF (without IFN- $\gamma$ : 0,38, with IFN- $\gamma$ : 0,78) have relative expression increased when treated with IFN- $\gamma$ , the values found for patient VG are higher than of those found on patient MF. On control cells it was observed a decrease on expression (without IFN- $\gamma$ : 29,96, with IFN- $\gamma$ : 24,76). On Thp1 cells and on B-EBV lymphocytes, there was an increase on *CYBB* expression in all tested cells when they were treated with IFN- $\gamma$ . Similar levels of *gp91-phox* expression were found on Thp1 cells (without IFN- $\gamma$ : 1,02, with IFN- $\gamma$ : 1,57), control (without IFN- $\gamma$ : 1,02, with IFN- $\gamma$ : 1,79), RVSS (without IFN- $\gamma$ : 0,87, with IFN- $\gamma$ : 1,53) and MF (without IFN- $\gamma$ : 0,13, with IFN- $\gamma$ : 1,47). Patient GCG presented the lowest levels of gene expression levels (without IFN- $\gamma$  0,19, with IFN- $\gamma$  2,2). Spliceosome proteins labeling showed an increase of fluorescence in addition to modification on the labeling pattern of Hep-2 adherent cells after IFN- $\gamma$  treatment. On

Thp1, IFN- $\gamma$  treatment also caused an increase on antigen labeling similar to those observed on Hep-2. In B immortalized lymphocytes from healthy individuals and of one CGD patient with splicing defects (IC) and of one CGD patient with non-sense mutation (MF) it was possible to identify labeling alterations on spliceosome proteins, they were more evident on Sm-RNPs proteins. On the patient that presented nonsense mutation (MF), the negative labeling patterns, SSA/Ro and Sm-RNP labeling were considered the same to those found on control group. These results indicate that IFN- $\gamma$  may influence *CYBB* expression by pre-transcriptional events. Our study shows that IFN- $\gamma$  increases the release of superoxide by cells from healthy individuals and as well as cells from the studied patients. This increase of superoxide release was higher by PMN cells. IFN- $\gamma$  also increases the expression of *gp91-phox* gene transcripts in cells from healthy individuals and from the studied CGD patients. IFN- $\gamma$  acts on the pre-transcriptional level increasing the quantity of proteins involved on the splicing process. By this manner, the observed results reinforce the importance of the use of IFN- $\gamma$  on patients with CGD and that present specific splicing defects.

**Key Words:** X linked Chronic Granulomatous Disease. X-CGD. Splicing. NADPH oxidase. IFN- $\gamma$ .



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Região promotora do gene <i>CYBB</i>	37
Figura 2. Liberação de superóxido por células polimorfonucleares e mononucleares	63
Figura 3. Liberação de superóxido por linfócitos B imortalizados de controle normal e pacientes com defeitos de “splicing” no componente <i>gp91-phox</i>	64
Figura 4. Análise RT-PCR da expressão gênica da <i>gp91-phox</i> antes e após o tratamento <i>in vitro</i> com IFN- $\gamma$ em linfócitos B transformados com EBV de controle e pacientes DGC ligados ao X	66
Figura 5. Quantificação relativa da expressão do gene da <i>gp91-phox</i>	69

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b> Mutações no gene <i>CYBB</i> identificadas em quatro pacientes com DGC	<b>61</b>
<b>Tabela 2:</b> Fluorescência para detecção de proteínas do spliceossomo mostrando diferenças no padrão de marcação de com o tratamento das células Hep2 com IFN $\gamma$	<b>72</b>
<b>Tabela 3:</b> Fluorescência para detecção de proteínas do spliceossomo mostrando diferenças no padrão de marcação após o tratamento das células Thp1 com IFN $\gamma$	<b>72</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato

Cit *b*<sub>558</sub> - Citocromo *b*<sub>558</sub>

CuZn-SOD - Cobre Zinco Superóxido Dismutase

DCs – Células Dendriticas

DGC - Doença Granulomatosa Crônica

DHR - 123 Dihidrorodamina

FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo

IRF – Fator Regulador de Interferon

MAPK - Proteina Kinases Ativado por Mitógeno

MPO – Mieloperoxidase

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogenase

NF-κB - Fator Nuclear-κB

NK - Natural Killers

PAF – Fator Ativador de Plaquetas

PAK - Kinase Ativada p21

PIDs - Immunodeficiencia Primária

PKA - Proteina Kinase A

PKC - Proteina Kinase C

PMA - 4β-Forbol 12-Miristato 13-Acetato

snRNP – Pequenas Ribonucleoproteinas Nucleares

SOD - Superóxido Dismutase

## LISTA DE SIMBOLOS

### BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina .....	A
Citosina .....	C
Guanina .....	G
Timina .....	T

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Os fagócitos e a geração de intermediários do oxigênio</b>	<b>22</b>
<b>1.2 O Sistema NADPH Oxidase</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Doença Granulomatosa Crônica</b>	<b>29</b>
<b>1.4 Relações Genótipo-Fenótipo e intervenção em pacientes com DGC</b>	<b>38</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>47</b>
<b>3 HIPÓTESE</b>	<b>48</b>
<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Objetivos Gerais</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos</b>	<b>49</b>
<b>5 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Pacientes</b>	<b>50</b>
<b>5.2 Obtenção de células</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Transformação de linfócitos B com vírus Epstein – Barr (EBV)</b>	<b>52</b>
<b>5.4 Cultura de linfócitos B imortalizados com EBV</b>	<b>52</b>
<b>5.5 Tratamento com IFN-<math>\gamma</math> <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i></b>	<b>53</b>
<b>5.6 Dosagem de Ânion Superóxido</b>	<b>53</b>
<b>5.7 Extração do RNA total</b>	<b>54</b>
<b>5.8 Obtenção de RNA</b>	<b>55</b>
<b>5.9 Transcrição Reversa (RT)</b>	<b>56</b>
<b>5.10 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)</b>	<b>56</b>
<b>5.11 Eletroforese em Gel</b>	<b>57</b>
<b>5.12 Real time PCR</b>	<b>57</b>
<b>5.13 Imunofluorescência Indireta (IFI) para Detecção de</b>	<b>58</b>

<b>Proteínas do Spliciossoma</b>	
<b>5.14 Análise Estatística</b>	<b>59</b>
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>6.1 Caracterização Clínica e Laboratorial dos Pacientes</b>	<b>60</b>
<b>6.2 Liberação de superóxido antes e após o tratamento com IFN-<math>\gamma</math> em células polimorfonucleares, mononucleares e linfócitos B imortalizados</b>	<b>61</b>
<b>6.3 PCR para detecção de transcritos antes e após o tratamento com IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>64</b>
<b>6.4 Real-Time PCR para gp91-<i>phox</i></b>	<b>67</b>
<b>6.5 Efeito do IFN-<math>\gamma</math> sobre proteínas do spliceossomo marcadas com fluorescência</b>	<b>70</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>82</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>105</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Os fagócitos e a geração de intermediários do oxigênio

Os fagócitos são células do sistema imune, responsáveis pela defesa do organismo contra bactérias, fungos e protozoários (Burg e Pillinger, 2001). O sistema fagocítico compreende dois principais grupos de células, os neutrófilos, e os monócitos e macrófagos teciduais. Os granulócitos permanecem na corrente sanguínea, onde têm vida média de 6 a 8 horas, até serem atraídos por sinais quimiotáticos específicos que promovem adesão ao endotélio, diapedese e migração para os locais onde uma resposta inflamatória. Ao contrário, os fagócitos mononucleares possuem vida média de 1 a 3 dias no compartimento intravascular e atuam principalmente como células residentes em tecidos como pulmão, fígado, baço e peritônio, onde podem permanecer durante meses a anos (Dinauer, 1998; Yang *et al.*, 1999). Outra característica que diferencia estes dois grupos de células é a capacidade de replicação de monócitos e macrófagos, em contraste com os granulócitos que não se multiplicam, seja na circulação ou nos tecidos (Yang *et al.*, 1999).

As células do sistema fagocítico pertencem à linhagem mielocítica com capacidade de reconhecimento, ingestão e lise de microorganismos. Por meio da geração de produtos da explosão respiratória, estas células estão relacionadas à lesão tecidual associada às reações inflamatórias, regulação da resposta imune e apoptose (Karlsson e Dahlgren, 2002).

O termo reativo intermediários do oxigênio compreende os radicais livres derivados no oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), além de outras espécies reativas que não são radicais livres, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio “singlet” ( $^1\Delta g$ ) e ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (Halliwell, 1994; Babior *et al.*, 2002), que desempenham ações microbicida, citotóxica e pró-inflamatórias (Roos *et al.*, 1996). O oxigênio molecular é usado primariamente na produção de energia celular por meio da síntese de adenosina trifosfato (ATP) pela fosforilação oxidativa, com a transferência de elétrons entre moléculas (Kerr *et al.*, 1996). No seu estado basal, o oxigênio molecular é um birradical, possuindo dois elétrons não pareados em orbitais paralelos (Taube, 1965; Ogryzlo, 1978). A redução completa do  $O_2$  pela via univalente

resulta na formação de água e ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (Badwey e Karnovsky, 1980).

O aumento abrupto do consumo do oxigênio por neutrófilos durante a fagocitose é distinto da respiração mitocondrial e foi descrito inicialmente por Baldrige & Gerard (1933). Este evento metabólico é conhecido como “explosão respiratória” (“respiratory burst”) e tem o  $O_2^-$  como produto inicial da redução de um elétron do  $O_2$  (Babior *et al.*, 1973; Chanock *et al.*, 1994), sendo a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenase (NADPH) a doadora específica de elétrons (Rossi e Zatti, 1964).

O superóxido é o principal reativo intermediário do oxigênio, podendo ser um produto do metabolismo oxidativo, das reações de oxidação e redução, ou da ativação do complexo NADPH oxidase dos fagócitos. A fonte de NADPH para os fagócitos ocorre de forma contínua, via hexose monofosfato (Rossi e Zatti, 1964).

O consumo de  $O_2$  em neutrófilos humanos aumenta de 50 a 100 vezes em menos de cinco segundos, após estimulação específica (Babior, 1978), e estímulos fisiológicos para o desencadeamento da “explosão respiratória” incluem microrganismos opsonizados, o fragmento C5a do sistema complemento, metionilpeptídeos N-formilados bacterianos, lipídeos bioativos como os produtos do metabolismo do ácido araquidônico, fator ativador de plaquetas (Platelet-Activating Factor/ PAF), leucotrieno B4 (Koo *et al.*, 1982; Koo *et al.*, 1983; McPhail e Snyderman, 1983; McPhail *et al.*, 1984; McPhail *et al.*, 1985) e interleucina-8 (Baggiolini *et al.*, 1989). Estímulos não fisiológicos incluem os fluoretos (Curnutte *et al.*, 1979), ésteres de forbol como o 4 $\beta$ -forbol 12-miristato 13-acetato (PMA - 4 $\beta$ -Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (Robinson *et al.*, 1985), o ionóforo de cálcio A23187 (Becker *et al.*, 1979) e partículas de zimosan (Burnham *et al.*, 1989). A “explosão respiratória” dos fagócitos é instável e de curta duração, cessando em segundos, quando o agonista é removido (Sklar, 1986).

Nos anos 40 foram iniciados estudos referentes ao complexo enzimático NADPH-oxidase, que se encontra presente em algumas células de origem mesodérmica, sendo mais estudado o encontrado nos fagócitos profissionais e linfócitos B (Assari, 2006). Este complexo enzimático é formado por proteínas presentes no citoplasma e na membrana plasmática, denominadas por sua massa molecular (em kilodaltons) e sufixo *phox* (abreviatura de *phagocyte oxidase*), onde a separação dos componentes em dois distintos compartimentos garante a inatividade do complexo quando as células não estão ativadas (DeLeo *et al.*, 1999).



O doador terminal de elétrons é um flavocitocromo *b* de baixo potencial (Segal *et al.*, 1978) designado citocromo *b*<sub>558</sub> devido ao seu espectro óptico com pico de absorvância em 558nm ou citocromo *b*-245 pela sua baixa voltagem, a -245mV (Dinauer *et al.*, 1987; Leusen *et al.*, 1996), o menor dentre todos os mamíferos, que o faz capaz de reagir diretamente com o oxigênio formando ânion superóxido (Segal e Jones, 1978). Nos fagócitos sem ativação, 20% dele está localizado nas membranas plasmáticas, e o restante em grânulos específicos. É um heterodímero contendo as subunidades  $\alpha$  ou p22-*phox* e  $\beta$  ou gp91-*phox* (Royer-Pokora *et al.*, 1986; Parkos *et al.*, 1988a) além de um FAD (flavina adenina dinucleotideo) e 2 grupos heme, funcionalmente distintos. A estabilidade de cada subunidade do citocromo *b*<sub>558</sub> depende da formação do heterodímero, portanto, qualquer alteração das subunidades leva à desativação do complexo (DeLeo *et al.*, 2000). Embora apenas 5% do citocromo *b*<sub>558</sub> esteja na membrana celular, assume-se que o sistema NADPH oxidase é acoplado e ativado exclusivamente na membrana do fagossomo. Aproximadamente 85% do citocromo *b*<sub>558</sub> está estocado nos grânulos específicos e nos grânulos de gelatinase, mas não está esclarecido se o citocromo *b*<sub>558</sub> contido nestes grânulos tem a habilidade de transferir elétrons para o oxigênio após a translocação dos grânulos para a membrana plasmática ou do fagossomo. Os outros 10% do citocromo *b*<sub>558</sub> estão nas vesículas secretoras, não estando também esclarecido se o citocromo *b*<sub>558</sub> neles contido teria habilidade para transferir elétrons para o oxigênio (Karlsson e Dahlgren, 2002).

As subunidades do citocromo *b*<sub>588</sub> são importantes para o transporte de elétrons e a redução do oxigênio molecular para ânion superóxido. O citocromo *b*<sub>588</sub> pode gerar superóxido na ausência dos componentes do citosol (Koshkin e Pick, 1994) sugerindo que este seja suficiente para dirigir o transporte de elétrons. Acredita-se que a FAD seja o carreador de elétrons, pois a atividade é perdida quando ela é retirada do sistema ou quando seus agonistas são utilizados (Babior e Peters, 1981).

A relevância clínica do sistema NADPH-oxidase pode ser demonstrada pela doença granulomatosa crônica (DGC), com marcante susceptibilidade a infecções piogênicas e fúngicas, que tem como defeito a incapacidade dos fagócitos em gerar superóxido por mutações em um dos genes que codificam as proteínas deste complexo, levando à perda ou desativação de um dos componentes do sistema. A heterogeneidade desta doença indica a complexidade do sistema e das interações entre suas subunidades para a formação do superóxido, nunca atuando como componentes isolados.

## 1.2 O Sistema NADPH Oxidase

O sistema NADPH-oxidase fagocítico humano é responsável pela “explosão respiratória”, que produz compostos reativos do oxigênio importantes para promover a morte de patógenos fagocitados. Este sistema é composto por p47-*phox*; p67-*phox* e p40-*phox*, que são encontrados na forma de um complexo no citosol de neutrófilos não ativados; rac-2 em monócitos ou rac-1 em granulócitos, uma proteína citosólica tipo ras; e p22-*phox* e gp91-*phox*, componentes da membrana que se associam formando o citocromo  $b_{558}$  (cit  $b_{558}$ ) (Burg e Pillinger, 2001).

A ativação dos fagócitos leva a associação dos componentes deste complexo enzimático iniciando o fenômeno da “explosão respiratória” com a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio ( $O_2$ ), produzindo ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O superóxido, um oxidante microbicida relativamente fraco, é metabolizado em um produto mais tóxico, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$ , por sua vez é convertido em ácido hipocloroso (HOCl) e ânion hidroxila ( $OH^-$ ) pela mieloperoxidase (MPO - Mieloperoxidase). Os neutrófilos ativados também convertem ânion nitrito ( $NO_2^-$ ) em oxidante pró-inflamatório nitril clorídrico ( $NO_2Cl$ ) e  $NO_2$  por uma via mieloperoxidase-dependente. A óxido nítrico sintase induzível e a mieloperoxidase localizam-se nos grânulos primários dos neutrófilos, sugerindo que os produtos destas vias -  $NO_2Cl$ ,  $NO_2$  e  $O_2^-$  - misturam-se no vacúolo fagocítico, formando vias alternativas de defesa (Eiserich *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1996)

O citocromo  $b_{558}$  é um heterodímero composto pela glicoproteína gp91-*phox* (subunidade  $\beta$ ) e pela proteína p22-*phox* (subunidade  $\alpha$ ). A subunidade  $\alpha$  contém 195 aminoácidos, com a porção amino terminal hidrofóbica, que poderia conter domínios na membrana. O gene que codifica esta proteína é denominado *CYBA* e está localizada no locus 24 do braço longo do cromossomo 16 (16q24) (Baehner *et al.*, 1986).

A subunidade  $\beta$  gp91-*phox* contém 570 aminoácidos, sendo glicosilada com carboidratos ligados à porção amino terminal, principalmente amino-acetil glicosamina e galactose (Segal *et al.*, 2000). O domínio amino-terminal desta proteína é hidrofóbico, com hélices transmembranas que se associam para formar uma barreira porosa na membrana; já a porção carboxi-terminal é a mais hidrofílica e atravessa a estrutura da

membrana indo até o citosol (Segal, 1996). O gene que codifica a proteína gp91-*phox*, *CYBB*, contém 13 exons e ocupa aproximadamente 30kb da região Xp21.1 do cromossomo X (Baehner *et al.*, 1986; Teahan *et al.*, 1987).

Defeitos em quaisquer das subunidades do citocromo *b*<sub>558</sub> resultam na ausência de ambos os componentes do citocromo *b*<sub>558</sub> na membrana dos fagócitos, sugerindo que as subunidades se estabilizam mutuamente. (Leusen *et al.*, 1996; Segal *et al.*, 2000).

Estudos realizados com o sistema “cell free” sem as proteínas citosólicas p47-*phox* e p67-*phox*, mostraram que o fluxo de elétrons ocorre normalmente através do citocromo *b*<sub>558</sub> com mutação da p22-*phox* ativado por fosfolipídeos de carga negativa, o que prova que a p22-*phox* e os demais componentes citosólicos atuam apenas como estabilizadores e ativadores do sistema. De fato, a transferência dos elétrons do NADPH para a molécula de oxigênio ocorre via flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e grupos heme que se encontram acomodados na porção hidrofílica da gp91-*phox* (Segal, 1996; Shatwell e Segal, 1996).

O p47-*phox* é uma proteína de 47 kDa, composta de 390 resíduos aminoácidos e codificada pelo gene *NCF-1*, localizado no cromossomo 7 (7q11.23) (Francke *et al.*, 1990). A fosforilação desta proteína determina um rearranjo conformacional, expondo domínios SH3, regiões ricas em prolina e domínios PX, que intermediam interações entre o citocromo *b*<sub>558</sub> e a p67-*phox*, interações estas que são fundamentais para o acoplamento das subunidades e ativação do sistema NADPH-oxidase (Leto *et al.*, 1994; Leusen *et al.*, 1996). Entretanto a fosforilação da p47-*phox* ocorre apenas quando o citocromo *b*<sub>558</sub> está presente na membrana, sugerindo que a fosforilação se complete após a translocação da p47-*phox* para a membrana (Heyworth *et al.*, 1989).

A seqüência de aminoácidos da p47-*phox* contém ao menos seis potenciais sítios de fosforilação de serina para a proteína quinase C (PKC - Protein Kinase C) (Leusen *et al.*, 1996), embora apenas um, na posição S379 seja necessário para a completa atividade da oxidase (Faust *et al.*, 1995). A inibição da PKC bloqueia tanto a associação da p47-*phox* com o citoesqueleto quanto à produção de O<sub>2</sub>· (Clark *et al.*, 1990), e outras quinases, como a proteína quinase A (PKA - Protein Kinase A) e a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinases), que também fosforilam a p47-*phox*, porém em locais diferentes da PKC, e não possuem efeito positivo sobre a produção de O<sub>2</sub>· (Park *et al.*, 1997).

A p67-*phox* é codificada pelo gene *NCF-2*, localizado no locus 25 do braço longo do cromossomo 1 (1q25) (Francke *et al.*, 1990). Ela interage com uma pequena

região da  $\alpha$ -hélice da gp91-*phox*, sobrepondo-se ao nucleotídeo domínio de ligação da NADPH-oxidase com função de ativação do sistema (Taylor *et al.*, 1993), além de possuir um domínio de ativação crítico para a função da NADPH oxidase (Han *et al.*, 1998). Mutações neste domínio eliminam a produção de  $O_2^-$ , mesmo que haja ligação normal à p47-*phox* e rac; esta região parece regular a transferência de hidrogênio do NADPH para o FAD (Babior *et al.*, 2002; Han *et al.*, 1998).

Através de experimentos de translocação foi observado que p67-*phox* não se transloca para a membrana plasmática em células de pacientes deficientes de p47-*phox* (Hayworth *et al.*, 1991), ao contrário, a p47-*phox* parece translocar-se normalmente em células deficientes de p67-*phox* (Heyworth *et al.*, 1991; Kleinberg *et al.*, 1992; Uhlinger *et al.*, 1994).

A p40-*phox* é um produto de 339 aminoácidos que se encontra associada à p67-*phox* no citoplasma de neutrófilos não estimulados (Wintjes *et al.*, 1993). O gene que codifica esta proteína é o *NCF-4*, localizado no cromossomo 22q13.1 (Zhan *et al.*, 1996). Esta proteína contém um domínio SH3 para associação com p47-*phox* (resíduos 358-390) e p67-*phox* (resíduos 144, 145, 187, 345) (Tsunawaki *et al.*, 1994). As funções da p40-*phox* ainda não estão bem esclarecidas, embora haja evidências tanto para a potenciação (Cross, 2000) quanto para a finalização (Sathyamoorthy *et al.*, 1997) das atividades do sistema NADPH-oxidase.

Estudos de ligação *in vitro* indicam que as proteínas p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox* ligam-se umas às outras por interação de domínios SH3 com regiões ricas em prolina, formando âncoras junto à membrana por associação entre a p47-*phox* e a região rica em prolina no carboxi-terminal da subunidade p22-*phox* (Leto *et al.*, 1994).

A proteína Rac pertence à subfamília Rho da superfamília Ras de pequenas proteínas (21kDa) ligadoras de GTP, que regulam diversas vias de transdução de sinais (Heyworth *et al.*, 1993). Há dois tipos de proteínas rac, a rac-1, expressa universalmente e a rac-2, expressa apenas em células da linhagem mielóide (Nakanishi *et al.*, 1992). No estado inativo, a p21rac forma um complexo com GDP-GDL, mas quando os neutrófilos são estimulados, o complexo se dissocia e a p21-rac, na sua forma ligada ao GTP, liga-se à p67-*phox* no complexo de ativação, que se transloca até a membrana (Abo *et al.*, 1994; Diekmann *et al.*, 1994). As funções da rac estão relacionadas às mudanças do estado inativo ligado a GDP para o estado ativo ligado a GTP, no qual a rac media a ativação da NADPH oxidase (Leusen *et al.*, 1996), embora isso seja controverso (Philips *et al.*, 1995). O papel da rac-2 na produção de  $O_2^-$  parece estar

relacionada a sua interação com p67-*phox* e estabilização desta proteína (Burg e Pillinger, 2001), e ancorar e induzir PAK (p21 Activated Kinase), uma enzima que fosforila especificamente a proteína p47-*phox*, uma vez que a PAK liga-se especificamente à rac na sua forma ligada à GTP e subsequentemente se auto-ativa (Burg e Pillinger, 2001; Knaus *et al.*, 1995).

A desativação do sistema NADPH oxidase pode ser induzida pela conversão da p21rac da forma GTP para GDP, retornando a rac-2 para o citosol, porém permanecendo as proteínas citosólicas *phox* associadas à membrana (Shatwell e Segal, 1996).

A Rap1A é uma proteína G de membrana da família Ras (Klebanoff e Nathan, 1993) que forma complexos estequiométricos com o citocromo *b*<sub>588</sub>, sendo a ligação do citocromo *b*<sub>588</sub> com a Rap1A-GTP mais forte que a ligação com a Rap1A-GDP. Essa ligação é desfeita quando ocorre fosforilação da Rap1A no resíduo de serina carboxi-terminal. A translocação da Rap1A até o citocromo *b*<sub>588</sub> parece ser importante para a atividade da oxidase e a fosforilação da Rap1A pode inibir a atividade da oxidase uma vez que é desfeita a associação com o citocromo *b*<sub>588</sub> (Didsbury *et al.*, 1989).

As proteínas rac-1, rac-2 e Rap1A regulam o sistema NADPH em locais diferentes. As rac ligam-se à p67-*phox* e interagem com o citoesqueleto, trazendo os componentes citosólicos para perto da membrana para que eles se liguem ao citocromo *b*<sub>588</sub>. Além disso, a rac também pode ativar os componentes citosólicos via PAKs, induzindo a fosforilação da p47-*phox*, o que provoca alterações conformacionais nesta proteína, expondo os domínios necessários para a interação com outros componentes do sistema. Já a Rap1A funciona em um ciclo dinâmico entre as formas ligadas a GTP e a GDP, regulando a ativação do sistema desta forma (Segal *et al.*, 2000).

As enzimas armazenadas no interior dos grânulos citoplasmáticos são importantes para promover a morte de patógenos intracelulares. A liberação do conteúdo ácido dos grânulos deveria provocar uma redução do pH no vacúolo fagocítico, entretanto o que se observou foi um aumento do pH. A passagem de íons hidrogênio do citoplasma para o interior do vacúolo poderia compensar a redução inicial do pH, sem, no entanto aumentá-lo. Assim parte do aumento do pH seria resultado do influxo de grandes quantidades de íons K<sup>+</sup>, que aumentaria o pH, tornando os vacúolos hipertônicos e favorecendo a ativação de enzimas proteolíticas. Portanto, a produção de componentes reativos do oxigênio causaria a entrada de íons K<sup>+</sup> para o vacúolo

provocando um aumento de pH e hipertonicidade que possibilitariam a ação das proteases (Messina *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2002; Segal, *et al.*, 1981).

### **1.3 Doença Granulomatosa Crônica**

A DGC foi descrita como uma entidade clínica em 1957, a qual acometia crianças do sexo masculino, causando pneumonia, linfadenite e abscessos (Berendes *et al.*, 1957; Landing e Shirkey, 1957; Bridges *et al.*, 1959). Caracteriza-se clinicamente como uma imunodeficiência grave e rara (incidência estimada de 1/250.000 nascidos vivos por ano), de manifestação precoce, cujos quadros infecciosos ocorrem predominantemente em locais considerados barreiras naturais do organismo (Segal *et al.*, 1983; Tauber *et al.*, 1983; Forrest *et al.*, 1988; Johnston, 2001; Winkelstein *et al.*, 2000; Segal *et al.*, 2000).

A maioria dos pacientes com DGC apresenta infecções graves e precoces durante o primeiro ano de vida, com diferenças em relação ao padrão genético da doença, uma vez que pacientes com a forma autossômica recessiva ou outras formas “variantes” tendem a apresentar quadro clínico menos grave, com início mais tardio dos sintomas (Liese *et al.*, 1996; Weening *et al.*, 1985; Winkelstein *et al.*, 2000).

Os granulomas característicos, algumas vezes com histiócitos pigmentados, são achados freqüentes em biópsias, entretanto, infiltrados inflamatórios inespecíficos são comuns nas infecções iniciais (Dinauer *et al.*, 2000).

Os principais locais acometidos pelos processos infecciosos são superfície cutânea e mucosa, vias respiratórias, do trato gastrointestinal e linfonodos que drenam estas áreas e tecidos adjacentes (Condino-Neto *et al.*, 1996; Condino-Neto *et al.*, 1993; Forrest *et al.*, 1988; Patino *et al.*, 1999a; Patino *et al.*, 1999b; Winkelstein *et al.*, 2000). Os quadros sépticos não são regras gerais, mas estão relacionados a eventos terminais (Forrest *et al.*, 1988; Landing e Shirkey, 1957).

Entre as infecções cutâneas destacam-se piodermite, furunculose e abscessos. Em adultos com quadro mais leve da doença, os achados dermatológicos podem ser particularmente proeminentes. Entre os portadores da forma ligada ao sexo é comum a

presença de lúpus discóide (Forrest *et al.*, 1988; Humbert *et al.*, 1976; Johnston *et al.*, 1985; Lindskov *et al.*, 1983).

A maioria das infecções é causada por *Staphylococcus aureus*, por bacilos gram-negativos e micobactérias. Entre os gram-negativos, a *Burkholderia cepacia* é uma causa comum de pneumonia, podendo evoluir rapidamente para sepse. Esta bactéria é frequentemente associada a DGC e fibrose cística, desenvolvendo resistência aos antibióticos convencionais (Bottone *et al.*, 1975; Speert *et al.*, 1994). O *Aspergillus spp.* é um dos principais agentes causadores das infecções pulmonares e tendem a invadir os tecidos adjacentes e os ossos da cavidade torácica (Wilhelm *et al.*, 2000). As infecções pulmonares são comuns (Cale *et al.*, 2000; Liese *et al.*, 2000; Martin-Mateos *et al.*, 1998; Ortega *et al.*, 1980; Winkelstein *et al.*, 2000), e os patógenos mais frequentes são *Staphylococcus aureus*, bacilos gram negativos e *Aspergillus*. Não existe um padrão radiológico característico, podendo a pneumonia apresentar-se na forma lobar, bronquial, difusa ou generalizada, frequentemente acompanhada de linfadenopatia hilar (Forrest *et al.*, 1988). A maioria dos casos de pneumonia é tratada com antibióticos. Entretanto, quando se suspeita de infecção fúngica ou não há resposta ao tratamento instituído pode ser necessária biópsia pulmonar, além da remoção cirúrgica do tecido infectado (Pogrebniak *et al.*, 1993). Na orofaringe, estes pacientes tendem a apresentar estomatite ulcerativa e gengivite (Forrest *et al.*, 1988; Renner *et al.*, 1991), esse último um achado comum entre portadores de X-DGC (Humbert *et al.*, 1976; Lindskov *et al.*, 1983).

O diagnóstico tem como base os aspectos clínicos da DGC e a comprovação laboratorial da falha na produção de reativos intermediários do oxigênio. O teste do NBT é o método mais simples e econômico para o diagnóstico de DGC (Ochs e Igo, 1973; Repine *et al.*, 1978; Repine *et al.*, 1979). O teste NBT positivo ocorre quando o corante NBT, amarelo e solúvel, é reduzido pelo superóxido, transformando-se em partículas azuis e insolúveis de formazan. Este método permite a identificação segura de portadores sãs do gene da DGC ligada ao sexo, bem como de pacientes com formas variantes de DGC (X91<sup>-</sup> ou X91<sup>+</sup>). Na interpretação desse teste, deve-se levar em conta a proporção de células positivas e a intensidade da redução do NBT no seu interior.

Ensaio por citometria de fluxo para avaliação da atividade NADPH oxidase propiciam não só medidas simultâneas da liberação de superóxido, mas também dados sobre sua distribuição no interior das células (Roesler *et al.*, 1991; Woodman *et al.*, 1995). O teste da 123 dihidrorodamina (DHR) aderida às membranas dos granulócitos

tem como princípio a capacidade de emissão de fluorescência pela DHR em contato com os reativos intermediários do oxigênio (Roesler *et al.*, 1991).

Outros testes diagnósticos para DGC incluem medidas quantitativas da atividade NADPH oxidase, como a liberação de superóxido, o consumo de oxigênio ou a produção de peróxido de hidrogênio. Entretanto, esses métodos avaliam a atividade NADPH-oxidase global das células, não sendo apropriadas para a detecção de portadores do gene para X-DGC (Hasui *et al.*, 1991).

O diagnóstico pré-natal pode ser feito aplicando o teste do NBT a leucócitos isolados de amostras de sangue fetal, obtido por punção percutânea umbilical ou vasos placentários. Este procedimento pode ser feito com segurança entre a 17ª e 19ª semana de gestação. O diagnóstico pré-natal de X-DGC ou DGC autossômica pode também ser feito por meio de análise de DNA dos vilos coriônicos ou líquido amniótico a partir da 10ª semana de gestação (De Boer *et al.*, 1992; De Boer *et al.*, 2002; Hossle *et al.*, 1994; Kenney *et al.*, 1993).

De acordo com o Grupo Pan-americano de Estudo em Imunodeficiências Primárias (PAGID), o diagnóstico de DGC é estabelecido para o indivíduo do sexo masculino ou feminino com teste de NBT ou atividade de explosão respiratória de neutrófilos alterados (menos de 5% dos controles) e que possuam um dos seguintes itens: mutação na *gp91-phox*, *p22-phox*, *p47-phox* ou *p67-phox*; ausência de mRNA observado por análise de “Northern-blot” para um dos genes citados; mãe, primos, tios ou sobrinhos com alteração no teste de NBT ou explosão respiratória (Conley *et al.*, 1999).

Alguns achados laboratoriais inespecíficos também podem refletir a presença de doença inflamatória, como neutrofilia, velocidade de hemossedimentação (VHS) elevada, anemia, hipergamaglobulemia policlonal (Bridges *et al.*, 1959; Roos e Curnutte 1999; Segal, 1991) e linfoproliferação frente a mitógenos policlonais normal ou aumentada (Condino-Neto *et al.*, 1996; Forrest *et al.*, 1988; Roos e Curnutte, 1999).

O defeito molecular da DGC reside na ausência, baixa expressão ou mau funcionamento de um dos componentes do sistema NADPH oxidase. Assim, na forma ligada ao sexo, é afetada a cadeia pesada do citocromo *b<sub>558</sub>*, no caso, o componente *gp91-phox* (56% dos casos) (Dinauer *et al.*, 1987). Nas formas autossômicas recessivas é afetado um dos componentes citosólicos da NADPH-oxidase, como a *p47-phox* ou *p67-phox* (33% e 5% dos casos respectivamente) (Clark *et al.*, 1989); ou o componente *p22-phox* também conhecido como cadeia leve do citocromo *b<sub>558</sub>*, (6% dos casos)



(Dinauer *et al.*, 1990; Parkos *et al.*, 1988). Até o momento não se documentou pacientes com DGC secundária a defeitos nos componentes p40-*phox*, rap1A, rac1, ou GDI, entretanto, foi verificada a presença de um paciente com imunodeficiência secundária a defeito no componente rac2 (Johnston Jr., 2001). Com base nestes achados, a classificação atual da DGC baseia-se nos defeitos moleculares específicos (Curnutte, 1988; Curnutte *et al.*, 1994; Winkelstein *et al.*, 2000; Segal *et al.*, 2000). O modo de herança é definido pela abreviação “A” para autossômico ou “X” para ligado ao sexo; o componente defeituoso da oxidase é representado pelo peso molecular da proteína afetada, “91”, “22,” “47,” ou “67”; e o nível de expressão da proteína daquele componente é indicado pelo sobrescrito “<sup>0</sup>” para ausente, “<sup>+</sup>” para presente, e “<sup>-</sup>” para reduzido. O fenótipo X91<sup>0</sup> é o mais freqüente, secundário a defeitos no gene *CYBB* no cromossomo X, que codifica a proteína gp91-*phox* e resulta na ausência de citocromo b<sub>558</sub> e atividade NADPH oxidase nula. O fenótipo X91<sup>-</sup> é menos freqüente, e se refere à forma variante da DGC, laboratorialmente caracterizada por neutrófilos com baixa atividade NADPH oxidase, proporcional ao nível de citocromo b<sub>558</sub> expresso (Lew *et al.*, 1981; Newburger *et al.*, 1986; Roos *et al.*, 1996b; Rae *et al.*, 1998). No fenótipo X91<sup>+</sup>, o citocromo b<sub>558</sub> encontra-se em níveis normais, entretanto sua atividade está diminuída ou ausente. A maioria das formas autossômicas recessivas da DGC não guarda expressão residual do componente afetado (fenótipos A22<sup>0</sup>, A47<sup>0</sup>, e A67<sup>0</sup>), entretanto formas variantes autossômicas ocasionais de DGC já foram descritas (Shurin *et al.*, 1983).

Dentre os defeitos no código genético de pacientes com DGC, ocorrem deleções, inserções e substituições. A maior parte destes pacientes tem mutações exclusivas de suas famílias. A diversidade destas mutações e os múltiplos genes afetados constituem uma explicação para a heterogeneidade clínica e genética da DGC (Curnutte, 1993; Roos *et al.*, 1996a; Dinauer *et al.*, 2000).

O número de mutações identificadas em pacientes com DGC autossômica é menor que na X-DGC, pela menor incidência de DGC autossômica. Nove famílias com deficiência de p22-*phox*, cerca de 40 famílias com deficiência de p47-*phox* e 11 famílias com deficiência de p67-*phox* tiveram suas mutações identificadas. Os resultados indicam que as bases genético-moleculares das deficiências de p22-*phox* e p67-*phox* são tão heterogêneas quanto às observadas nas deficiências de gp91-*phox*, ligadas ao X, enquanto os casos de deficiência de p47-*phox* são mais homogêneos (Roos *et al.*, 1996a; Rae *et al.*, 1998; Croos *et al.*, 2000).

Em nove famílias com mutações na p22-*phox*, 10 diferentes mutações foram descobertas em 18 alelos, incluindo deleções e inserções, substituições próximas aos sítios de “splicing”, e mutações missense (MIM 233690) (Cross *et al.*, 1996; Roos *et al.*, 1996b). Em sete famílias os pacientes eram homozigotos para as mutações encontradas, enquanto em duas famílias os pacientes eram heterozigotos compostos. Somente em duas famílias não relacionadas, foram encontrados pacientes com a mesma mutação. Somente quatro polimorfismos da p22-*phox* foram identificados. Portanto, pequenas alterações na composição desta proteína parecem resultar em instabilidade intrínseca ou instabilidade secundária a baixa interação com a gp91-*phox*, ao compor o citocromo *b*<sub>558</sub> (Dinauer *et al.*, 2000).

Em 35 pacientes não relacionados com deficiência da p47-*phox* (MIM 233700), foi identificada uma deleção de dois nucleotídeos na repetição GTGT, correspondente às quatro primeiras bases do segundo exon do gene *NCF1* (Chanock *et al.*, 1991; Casimir *et al.*, 1991; Iwata *et al.*, 1994; Volpp e Lin, 1993). Em 31 destes casos a deleção GT foi homozigota em um dos outros quatro pacientes, outra mutação de um nucleotídeo foi identificada além da deleção GT. No entanto, a amplificação por PCR do cDNA ou gDNA de indivíduos normais, revelou a presença simultânea da seqüência GTGT e do produto com a deleção GT, sugerindo a existência de um pseudogene com a deleção GT, além do gene *NCF1*, e que a DGC autossômica por defeito da p47-*phox* se deve a recombinação entre o gene *NCF1* e o pseudogene relacionado (Gorlach *et al.*, 1997). Recentemente, foram também descritos casos de DGC secundários a defeitos na p47-*phox*, por mutações não relacionadas ao pseudogene (Noack *et al.*, 2001).

Dos 11 pacientes descritos com DGC autossômica por deficiência de p67-*phox* (MIM 233710), 11 diferentes mutações foram identificadas em 22 alelos afetados. Estas incluem mutações “missense”, “nonsense”, substituições nos sítios de “splicing”, uma inserção de dinucleotídeo e uma variedade de deleções, cujos tamanhos variam de alguns nucleotídeos até 11-13 kb (Aoshima *et al.*, 1996; Patino *et al.*, 1999b; Leusen *et al.*, 1996; Nuno *et al.*, 1995; Tanugi-Cholley *et al.*, 1995; De BOER *et al.*, 1994). Em alguns casos de DGC autossômica por deficiência de p67-*phox*, o nível de mRNA para p67-*phox* foi normal, mas a quantidade da proteína p67-*phox* mostrou-se indetectável. Entretanto, em um dos pacientes com uma deleção de tres nucleotídeos (1718-1720), cerca de 50% da quantidade da proteína estava presente. Neste paciente, a mutação indicou uma deleção na “moldura” (LYs-58) e resultou na expressão de uma p67-*phox* não funcional que não se transloca para a membrana plasmática (Leusen *et al.*, 1996).

O gene *CYBB*, que codifica a grande subunidade glicosilada do citocromo b<sub>558</sub>, denominada gp91-*phox*, contém 13 exons e ocupa aproximadamente 30 kb da região Xp21.1 do cromossomo X (Baehner *et al.*, 1986). Diversos defeitos moleculares que levam a X-DGC, foram identificados na região codificadora, em introns e nas regiões 5' regulatórias do gene *CYBB* (Roos *et al.*, 1996b; Rae *et al.*, 1998; Frey *et al.*, 1988; De Saint-Basile *et al.*, 1988; Dinauer *et al.*, 1989; Bolscher *et al.*, 1991; Schapiro *et al.*, 1991; De Boer *et al.*, 1992; Rabbani *et al.*, 1993; Ariga *et al.*, 1994a; Ariga *et al.*, 1994b; Leusen *et al.*, 1994; Newburger *et al.*, 1994a; Ariga *et al.*, 1995; Azuma *et al.*, 1995; Bu-Ghanim *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 1995; Ariga *et al.*, 1998; Newburger *et al.*, 1994b; Suzuki *et al.*, 1998; Heyworth *et al.*, 2001; Segal *et al.*, 2000). Uma coleção inicial de mutações que levam ao fenótipo de DGC, identificadas por um grupo internacional de investigadores, foi compilada por Roos e colaboradores numa base de dados computadorizada, acessível pela internet no endereço <http://www.helsinki.fi/science/signal/databases/x-cgdbase.html> (Roos *et al.*, 1996a). Posteriormente mais de 300 mutações que levam ao fenótipo de X-DGC, identificadas por um grupo internacional de investigadores, foi compilada numa base de dados computadorizada, acessível pela internet no endereço <http://www.uta.fi/imtbioinfo/CYBBbase> (Heyworth *et al.*, 2001).

Os tipos de mutações que causam X-DGC incluem grandes deleções multigênicas, deleções e inserções menores, substituições do tipo “missense” e “nonsense”, bem como defeitos de “splicing”. Estudos demonstram que as mutações se distribuem com frequência similar entre os exons e as bordas dos genes. Famílias não relacionadas nestes estudos serviram como base para os cálculos das frequências relativas de diferentes tipos de mutações. A heterogeneidade das mutações e a falta de um genótipo predominante mostraram que a incidência mundial de DGC é consequência de inúmeros eventos mutacionais (Roos *et al.*, 1996b; Rae *et al.*, 1998; Winkelstein *et al.*, 2000; Segal *et al.*, 2000).

Rae e colaboradores (Rae *et al.*, 1998) identificaram as mutações no gene *CYBB* que levaram ao fenótipo de X-DGC em 131 famílias consecutivas e independentes. O rastreamento por meio de SSCP (“single strand conformation polymorphism analysis”) identificou mutações em 124 famílias. O sequenciamento completo dos exons e regiões próximas às bordas dos introns revelaram outras sete mutações. Neste estudo foi possível identificar 103 diferentes mutações específicas, sendo que nenhuma mutação isolada se repetiu em mais que sete famílias independentes. Os tipos de mutações

observados foram grandes e pequenas deleções (11%), "frameshifts" (24%), mutações "nonsense" (23%), mutações "missense" (23%), mutações na região do "splicing" (17%) e mutações nas regiões reguladoras (2%). A distribuição das mutações ao longo do gene *CYBB* mostrou-se bastante heterogênea, não se identificando nenhum locus preferencial para sua ocorrência.

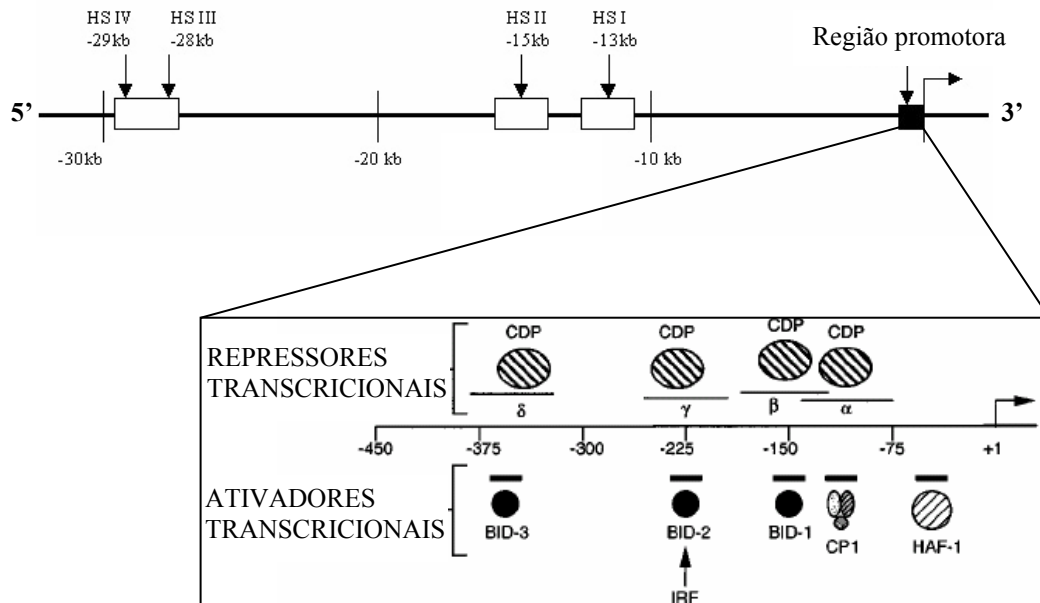
Na América Latina, Patino e colaboradores estudaram sete famílias não relacionadas na Colômbia e no Brasil. Neste estudo, seis mães eram portadoras de um alelo *CYBB* mutante, sendo que um dos casos deveu-se a mutação "de novo". Identificou-se uma substituição A por G no penúltimo nucleotídeo do intron 12, quatro novas mutações "nonsense" (R91X, W106X, R157X, R290X), além de outras duas mutações "missense" (E225V, C244Y) (Patino *et al.*, 1999a).

Mutações próximas aos sítios de "splicing" levam a DGC, interferindo com o processamento do RNA mensageiro, foram documentadas em 39 de 251 casos estudados (Roos *et al.*, 1996a; Rae *et al.*, 1998; Winkelstein *et al.*, 2000; Segal *et al.*, 2000). A maioria ocorreu nos sítios de "splicing", e resultaram no fenótipo X91<sup>0</sup> devido a deleção de um ou mais exons, como na maioria das mutações "splicing" que levam a X-DGC, anteriormente documentadas (De Boer *et al.*, 1992). Entretanto, numa minoria de casos, tais mutações levam ao fenótipo X91<sup>-</sup>, devido à manutenção parcial do "splicing" normal (Rae *et al.*, 1998). Uma destas famílias, assunto de nossa pesquisa, mostrou-se especialmente responsiva ao tratamento com interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), com restauração quase completa da atividade oxidase *in vitro* e *in vivo*, e pelo aumento dos níveis de transcritos de mRNA (Ezekowitz *et al.*, 1987; Ezekowitz *et al.*, 1988; Condino-Neto *et al.*, 1997; Condino-Neto e Newburger, 2000).

O gene *CYBB* humano tornou-se um modelo interessante para ilustrar a complexidade dos mecanismos moleculares de transcrição linhagem específica (Skalnik, 2002), e de diferenciação fase específico, por ser ativamente expresso após estágio pró-mielocítico de células mielóides (Royer-Pokora *et al.*, 1986; Leto *et al.*, 1990). 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 *et al.*, 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, como STAB1, CDP (do Inglês “CCAAT displacement protein”) (Eklund *et al.*, 2000) e Pbx1 expressos constitutivamente em células indiferenciadas (Eklund 2000; 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 PU.1 e o Elf-1 (Woodman *et al.*, 1995; Bei *et al.*, 2005; Skalnik, 2002) à região promotora do gene *CYBB*. Outros elementos *cis* positivos induzidos pelo IFN- $\gamma$  também são necessários para a ativação da transcrição do gene *CYBB* (Eklund *et al.*, 1998; Eklund e Kakar, 1999), como 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- $\gamma$  (Eklund e Skalnik, 1995). Estudos adicionais (Eklund *et al.*, 1996) 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 (“Binding Increased During Differentiation”). A Figura 1 mostra um esboço de alguns elementos transcricionais ativadores e repressores que competem pela ligação à região promotora do gene *CYBB*. Anrather, Racchumi & Iadecola (2006) demonstraram que o NF- $\kappa$ B está envolvido na transcrição do gene codificador do componente gp91-*phox* da NADPH oxidase em modelo experimental murino. Nosso grupo demonstrou recentemente a relevância do NF- $\kappa$ B para a transcrição do *CYBB* e ativação da NADPH oxidase em leucócitos humanos (Luengo-Blanco *et al.*, 2008).



**Figura 1. 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  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , indicam posições de cada um dos quatro oligonucleotídeos utilizados como sítios de ligação para CDP. Barras acima dos fatores de ativação transcricional denotam correspondência à DNase I (adaptado de Luo e Skalnik, 1996).

Em 2005, Thomas e colaboradores, relataram o 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 em inibição da expressão do *CYBB* por um mecanismo de repressão da transcrição desse gene associada com a redução da expressão do fator regulatório 1 do interferon (IRF-1) e PU.1 nos extratos nucleares das células infectadas por *Anaplasma 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 *CYBB*.

## 1.4 Relações Genótipo-Fenótipo e intervenção em pacientes com DGC

Casos de DGC autossômica p22-*phox* e p67-*phox* são tão graves quanto os de X-DGC por defeito na gp91-*phox*. Por outro lado, diversas comparações clínicas entre X-DGC e DGC autossômica secundária a defeitos na p47-*phox* sugerem que esta última tem evolução mais benigna (The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group, 1991; Margolis *et al.*, 1990; Weening *et al.*, 1985), o que pode ser atribuída à atividade NADPH oxidase residual (Cross e Curnutte, 1995; Cross *et al.*, 1994; Bemiller *et al.*, 1995; Winkelstein *et al.*, 2000). Espera-se que pacientes com o fenótipo X91<sup>-</sup>, com atividade NADPH oxidase residual de 3-30% tenham evolução mais benigna do que aqueles com fenótipos X91<sup>0</sup> e X91<sup>+</sup> (Roos *et al.*, 1992).

Os cuidados profiláticos são de extrema importância para os indivíduos com DGC, e incluem a prevenção das infecções por meio de imunizações e remoção das fontes de patógenos; uso de antibiótico profilático e interferon-gama humano recombinante. Em vigência de um quadro infeccioso é recomendado o uso precoce e agressivo de antibióticos parenterais, para impedir que as infecções sobrepujem o já comprometido sistema imunológico do paciente com DGC e, para os casos de persistência de foco infecciosos ou difícil tratamento pode ser necessária drenagem cirúrgica ou ressecção dos mesmos (Roos e Curnutte, 1999).

Todos os pacientes devem receber as imunizações de rotina (incluídas as vacinas de vírus vivos atenuados), bem como a vacina anual contra influenza. Vacinas contendo bactérias vivas atenuadas, como BCG, são contra-indicadas pelo risco de reações adversas graves (Casanova *et al.*, 1996; Grumach *et al.*, 1997; Pasic *et al.*, 1998).

Em pacientes com DGC é comum a persistência de microorganismos no interior dos fagócitos, e o antibiótico escolhido para profilaxia e tratamento das infecções deve ter capacidade de penetração e ação intracelular. Antibióticos lipofílicos como a clindamicina, sulfametoxazol+trimetoprim (SMZ+TMP), cipro e a rifampicina possuem esta característica e tem preferência de uso em pacientes com DGC. Estes antibióticos são capazes de reduzir a densidade bacteriana no interior dos polimorfonucleares a níveis comparáveis aos de polimorfonucleares oriundos de indivíduos normais, ao passo que a dicloxacilina, gentamicina e a cefazolina não são eficazes contra *Staphylococcus aureus* (Jacobs e Wilson, 1983).

A profilaxia com SMZ+TMP (5mg/Kg/dia, via oral em uma ou duas doses, até o máximo de 160mg de TMP) reduz pela metade a incidência de infecções bacterianas. A hipótese de que a SMZ+TMP inibe a catalase bacteriana, permitindo a utilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela bactéria, não foi comprovada, assim como o aumento no metabolismo oxidativo (Gmunder e Seger, 1981; Johnston *et al.*, 1975). A possibilidade de sinergismo entre doses profiláticas de SMZ+TMP com mecanismos não dependentes do oxigênio não pôde ser comprovada em estudo realizado por Gmunder e Seger (1981), ao passo que outros autores demonstraram um aumento significativo na produção de óxido nítrico por neutrófilos de pacientes com DGC em uso de SMZ+TMP profilático, sugerindo que o benefício observado com o uso desta medicação deve-se ao incremento no metabolismo do óxido nítrico (Tsuji *et al.*, 2002).

Para prevenir infecções fúngicas é recomendado o uso do itraconazol na dose de 10 mg/Kg/dia (Mouy *et al.*, 1994). Ainda não foram realizados estudos comparativos randomizados sobre o efeito profilático do itraconazol na redução da incidência de infecções fúngicas, entretanto, alguns estudos retrospectivos demonstraram menor número de infecções por *Aspergillus* em grupos de pacientes que receberam esta medicação (Cale *et al.*, 2000; Liese *et al.*, 2000; Mouy *et al.*, 1994).

O IFN- $\gamma$  foi identificado há 30 anos atrás através da sua atividade antiviral em sobrenadantes de cultura de linfócitos ativados com fito-hemaglutinina (PHA) (Wheelock, 1965; Kerr *et al.*, 1992; Staeheli, 1990; Revel *et al.*, 1986) e, recentemente, estudos sobre o gene e receptores do IFN- $\gamma$  tiveram seus assuntos revisados (Farrar *et al.*, 1993) destacando-o como o maior colaborador da cascata de sinalização JAK-STAT via transdução e regulação transcricional mediada por citocinas (Darnell *et al.*, 1994; Ihle *et al.*, 1995; Ihle, 1996; Schindler e Darnell, 1995). Seu princípio se baseia na ativação de membros específicos de duas famílias de proteínas, a Janus Kinases (JAKs) e os transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs), utilizados por mais de 30 membros da superfamília de receptores de citocinas (Ihle, 1996). A ligação de uma citocina ao seu receptor promove o recrutamento e ativação de padrões distintos de proteínas STAT que, após ser ativados pela fosforilação da tirosina, migra para dentro do núcleo e medeia a transcrição de genes específicos à citocinas. Além destes estudos, a importância do perfil de liberação de citocinas na definição dos subtipos de células T helper (Th1 e Th2) (Mosmann, 1989; Romagnani, 1994) e na determinação da modalidade das respostas imunes mediadas por células T (Seder e Paul, 1994; Trinchieri, 1995; Young e Hardy, 1995), mostraram consequências profundas na



modalidade de respostas e na resistência a patógenos (Bancroft *et al.*, 1991; Sher e Coffman, 1992; Reiner e Locksley, 1995).

O IFN- $\gamma$  regula a expressão de moléculas classe II do MHC e síntese induzida de óxido nítrico, interações entre os leucócitos e o endotélio, indução de componentes da cascata do sistema complemento e apoptose (Johnson, 2001)

Em 1990, Staeheli foi capaz de listar 20 genes regulados pelo IFN- $\gamma$  (Staeheli, 1990). Hoje em dia essa lista contém mais de 200 genes (<http://www.annurev.org/sup/material.html>), incluindo genes cujos mRNA estão envolvidos na indução, repressão, estabilização, ou desestabilização após estimulação celular sob condições apropriadas com IFN- $\gamma$  (Boehm *et al.*, 1997)

O IFN- $\gamma$  é produzido por células NK (Perussia, 1991), células T CD4 do padrão Th1 (Mosmann e Coffman, 1989), e células T CD8 com padrão TC1 (Sad *et al.*, 1995). O principal indutor de síntese IFN- $\gamma$  é a ligação cruzada do complexo receptor da célula T (TCR) (Ullman *et al.*, 1990), sujeito a outras condições regulatórias impostas pelo estágio de diferenciação da célula responsiva. Nas células NK, a produção de IFN- $\gamma$  é estimulada por citocinas derivadas dos macrófagos, como TNF- $\alpha$  e IL-12 (Trinchieri, 1995) ou pelo próprio IFN- $\gamma$  secretado (Hardy e Sawada, 1989; Bancroft *et al.*, 1991).

No decorrer da década de 90, os genes que codificam o IFN- $\gamma$  e seu receptor foram identificados e clonados (Farrar e Schreiber, 1993; Pellegrini e Schindler, 1993). Em contraste ao IFN- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  humano assim como o de camundongo é codificado por uma única cópia de um gene, gerando uma única espécie de mRNA de 1-2kb (Derynck *et al.*, 1982) e um polipeptídeo de 166 resíduos incluindo uma seqüência clivada de sinal hidrofóbico de 23 resíduos (Rinderknecht *et al.*, 1984). O IFN- $\gamma$  biologicamente ativo é encontrado na forma de um homodímero não covalente de 34 kDa (Greenlund *et al.*, 1992; Fountoulakis *et al.*, 1992), e a sua estrutura homodimérica confirmada por análises de raio-X (Ealick *et al.*, 1991).

O IFN- $\gamma$  interage com receptor específico de superfície celular, que é ubíqua, porém não uniformemente expresso em todas as células nucleadas (Valente *et al.*, 1992), em níveis modestos (200-25000 sítios/célula) (Farrar e Schreiber, 1993), além disso, este receptor é altamente expresso fora do sistema linfóide (Farrar e Schreiber, 1993; Valente *et al.*, 1992). O receptor de IFN- $\gamma$  é composto por duas subunidades, a cadeia- $\alpha$  de 90-kDa, exibindo alta afinidade ( $K_a=10^9-10^{10} M^{-1}$ ) (Farrar e Schreiber, 1993) e propriedades de ligação do ligante, e a cadeia- $\beta$  composta por 314 aminoácidos, requerida para a sinalização. Cada cadeia é constitutivamente associada com uma

proteína Janus Kinase específica (Igarashi *et al.*, 1994) (a cadeia- $\alpha$  com JAK1 e a cadeia- $\beta$  com JAK2). O sinal de transdução começa a interação do homodímero IFN- $\gamma$  com dois receptores de cadeia- $\alpha$ , induzindo a dimerização da cadeia- $\alpha$  (Fountoulakis *et al.*, 1992; Greenlund *et al.*, 1993). A associação de duas cadeias- $\beta$  com o complexo da cadeia- $\alpha$  do receptor de IFN- $\gamma$  promove a transfosforilação e ativação recíproca das JAKs. As JAKs ativadas fosforilam os resíduos 440 das tirosinas em ambos receptores da cadeia- $\alpha$ , criando dois sítios justapostos de ligação para os domínios SH2 de STAT1 $\alpha$  latente citosólicos (91kDa) (Greenlund *et al.*, 1994). A fosforilação de STAT1 $\alpha$  na posição 701 (tyr 701) promove a dissociação do complexo receptor de STAT1 $\alpha$  e a formação de STAT1  $\alpha$ -homodímeros (Greenlund *et al.*, 1995). O homodímero STAT1- $\alpha$  então se transloca para o núcleo, onde é capaz de ligar-se a seqüências específicas de DNA (TTNCNNNA, GAS – “gamma activated site”) e iniciar a transcrição. Os níveis do homodímero STAT1 $\alpha$  fosforilados são negativamente regulados pelo mecanismo proteossômico ubiquitinizado, decrescendo após um pico de 15-30 minutos para níveis baixos entre 1-2h (Kim e Maniatis, 1996). Após a sinalização o complexo receptor-cadeia- $\alpha$  receptor ligante de IFN é internalizado e se dissocia (Farrar e Schreiber, 1993). Na maioria dos tipos celulares, a cadeia- $\alpha$  desaclopada recicla é devolvida a superfície celular. Num número limitado de tipos celulares, no entanto, a internalização da cadeia- $\alpha$  é deficiente (Farrar e Schreiber, 1993). Em fibroblastos, o IFN- $\gamma$  livre é degradado no compartimento lisossomal (Anderson *et al.*, 1983), porém a acumulação nuclear, mediada pelo transporte ativo, tem sido descrito em leucemia murina (células L1210) (Bader e Wietzerbin, 1994).

Através da ativação de fatores de transcrição citosólicos latentes como GAF, o IFN- $\gamma$  inicia a transcrição de certa quantidade de genes suportando elementos GAS cabíveis nas suas regiões promotoras. Isto direciona a ativação transcricional que será referida como respostas primárias ao IFN- $\gamma$  porque ela não requer a síntese de novos fatores de transcrição. Vários genes de respostas primárias são por si próprio fatores de transcrição e são requeridos para a indução dos outros, componentes secundários das respostas celulares ao IFN- $\gamma$  (Cassatella *et al.*, 1990; Grupta *et al.*, 1992; Skalink, 2002)

O IFN tipo I ( $\alpha/\beta$ ) e tipo II ( $\gamma$ ) funcionam via receptores de superfície diferentes e produzem distintos, porém parcialmente sobrepostos, efeitos celulares apesar de induzirem sobrepostos, porém conjuntos gênicos não idênticos (Staeheli, 1990). Os sinais de transdução dos IFN  $\gamma/\alpha/\beta$  são distintos até mesmo quando ativam o mesmo gene, apesar de compartilharem componentes da maquinaria de transdução JAK-STAT.

Através da ligação ao seu receptor específico, o IFN- $\alpha$  ativa fatores de transcrição citosólicos latentes como STAT1 $\alpha$  (91kDa), STAT1 $\beta$  (84KDa) (derivados de splicing diferentes de produtos de mRNAs do mesmo gene) (Schindler *et al.*, 1992) e STAT2 (113 kDa). Estes combinam com a proteína ISGF3 $\gamma$  ou p48 para formar o fator de transcrição ISGF3 (Interferon Stimulated Gene Factor 3), que transloca para dentro do núcleo e inicia a transcrição de genes com ISREs (AGTTTCNNTTTCNC/T, IFN-stimulated response elements) dentro da região promotora. Em analogia ao IFN- $\gamma$ , esta ativação transcricional direta de um grupo específico de genes ocorre sem a necessidade da síntese de uma nova proteína é referida como resposta primária ao IFN- $\alpha$  (Voo e Skalink, 1999; Islam *et al.*, 2002).

O IFN- $\gamma$  aumenta a expressão de STAT1 (Watling *et al.*, 1993), do componente do ISGF3, e da proteína p48, que fornece especificidade de ligação do ISRE ao DNA. Com o aumento dos níveis de STAT1 e p48, o pré-tratamento com IFN- $\gamma$  pode aumentar a resposta ao IFN- $\alpha$  ( $\gamma$ -priming) (Gao *et al.*, 1993). O p48 recém sintetizado pode também se associar com GAF, direcionando sua especificidade em termos de reconhecimento de DNA dos boxes de GAS ao ISRE (Bluyssen *et al.*, 1995). O envolvimento de p48 na resposta ao IFN- $\gamma$  é demonstrado em linhagens celulares modificadas expressando uma versão truncada do p48, que em algumas induções transcricionais de alguns genes pelo IFN- $\gamma$  é afetado (John *et al.*, 1991). A especificidade transcricional da transcrição induzida pelo IFN- $\gamma$  pode ser modificada em uma resposta secundária para incluir genes responsáveis ao IFN- $\alpha/\beta$ . A validade geral desse modelo evidencia a importância do STAT1 na resposta ao IFN foi observada em camundongos deficientes para genes STAT1 não responsivos ao IFN- $\alpha/\beta$  ou IFN- $\gamma$  (Meraz *et al.*, 1996; Durbin *et al.*, 1996). Pela grande similaridade dos motivos ligantes de DNA conhecidos por diferentes fatores STAT e evidência *in vitro* para sobreposição na função, atividades associadas a IL-4 (STAT6), IL-6 (STAT3), e IL-1 (STAT12) não se mostraram alterados neste modelo de camundongo (Kumatori *et al.*, 2002).

A elucidação dos mecanismos de sinalização levou a descoberta de uma nova família de fatores de transcrição, denominados IRFs (Interferon Regulatory Factors), consistindo de pelo menos 4 membros descritos com detalhes, chamados: IRF-1, IRF-2, p48 e ICSBP (Eklund e Kakar, 1999)

Respostas do padrão Th1 são associadas à imunidade mediada por células, enquanto que respostas do padrão Th2 estão associadas com mecanismos efetores mediados por anticorpos (Mosmann, 1989; Romagnani, 1994). Nas respostas Th1 o

IFN- $\gamma$  estimula a imunidade celular através das células NK, T CD8 e macrófagos. Em infecções experimentais com patógenos intracelular como *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii* e *Listeria monocytogenes*, a atenuação da resposta Th1, e a interferência na produção ou ação do IFN- $\gamma$  (Sher e Coffman, 1992; Reiner e Locksley, 1995), previne a eliminação do patógeno. A resposta Th2 está associada à produção de anticorpos competentes para sensibilizar mastócitos e granulócitos (IgG1 e IgE em humanos e camundongos), e modificações mediadas por linfocinas para hemopoiese, como a indução de eosinofilia mediada por IL-5.

A modulação do padrão de é determinado pelas citocinas durante a ativação da célula T na resposta primária ao antígeno (Seder e Paul, 1994). O IL-12 e IFN- $\gamma$  estão implicados na decisão para adotar um fenótipo Th1, enquanto IL-4 direciona a adoção do fenótipo Th2.

O aumento da expressão das moléculas das classes I e II do MHC na superfície celular (Revel e Chebath, 1986, Rosa *et al.*, 1986) após a exposição ao IFN- $\gamma$  inicia o aumento da expressão de vários genes diferentes cujos produtos contribuem para os mecanismos de apresentação antigênica. Uma característica marcante de ambos os mecanismos é que a maioria dos participantes ativos são codificados no MHC, porém não há razão para acreditar que isto tem algo haver com a regulação coordenada pelos IFNs. Em um caso, no entanto, a co-localização, exceto pela causa original, tem possibilitado a co-regulação de 2 membros estruturalmente não-relacionados dos mecanismos de apresentação da classe I (TAP1 e LMP2) pelo uso de um promotor em comum (Wright *et al.*, 1995; Mine *et al.*, 1996).

A ativação de macrófagos por células T específicas *in vivo* e por sobrenadantes de linfócitos T estimulados *in vitro* (Nathan, 1992), representa uma das maiores manifestações das repostas celulares ao IFN- $\gamma$  e a imunidade Th1 específica. O fator ativador de macrófagos (MAF) liberado através de linfócitos T estimulado por antígenos foi demonstrado ser o IFN- $\gamma$  (Nathan *et al.*, 1983). Macrófagos ativados demonstraram atividade microbicida aumentada para vários organismos intracelulares e fagocitados como *Mycobacterium*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, e *Leishmania*. A ativação é acompanhada pela liberação de dois tipos diferentes de moléculas efetoras tóxicas, chamados intermediários incompletamente reduzidos do oxigênio como o peróxido de hidrogênio, e óxido nítrico. Dois mecanismos distintos estão envolvidos na indução dessas atividades antimicrobiais sobrepostas. Em ambos os casos, o IFN- $\gamma$

regula a transcrição de vários genes que coordenadamente ativam o estado efetor. Modificações similares são observadas em neutrófilos (Nathan, 1992).

Vários componentes da maquinaria celular da produção de superóxido têm sido identificados a nível molecular (Baggiolini *et al.*, 1993). A formação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) é mediada pela oxidase dependente NADPH associado à membrana, e o complexo enzimático flavocitocromo multicomponente catalisa a redução de um elétron de uma molécula de oxigênio para  $O_2^-$ . Os quatro componentes da oxidase (duas subunidades do citocromo  $b_{558}$ , gp91-*phox* ou cadeia pesada e gp22-*phox* ou cadeia leve estão localizadas na membrana celular, enquanto p47-*phox* e p67-*phox* estão presentes no citosol), que diferem na sua localização subcelular foram previamente caracterizados. A perda da função devido à mutação na componente gp91-*phox* é uma das principais causas da doença granulomatosa crônica (DGC) (Orkin, 1989).

O IFN- $\gamma$  é capaz de ativar macrófagos *in vitro* e *in vivo*, estimulando a síntese de reativos intermediários do oxigênio a partir do sistema NADPH oxidase. Por esta característica, o IFN- $\gamma$ , na forma humana recombinante, começou a ser utilizado para os pacientes com DGC (Ezekowitz, 1992; Curnutte, 1993; International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group, 1991; Woodman *et al.*, 1992).

O IFN- $\gamma$  humano recombinante está indicado na dose de 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  de superfície corporal, por via subcutânea, três vezes por semana. Ele reduz o risco relativo de infecções graves em 70% dos casos e seus efeitos colaterais mais frequentes são cefaléia moderada, febre baixa poucas horas após sua administração. Seu mecanismo de ação não se encontra totalmente esclarecido, embora seja descrito seu papel nas formas variantes e autossômicas recessivas de DGC (Bemiller *et al.*, 1995; Condino-Neto *et al.*, 1993; Ezekowitz *et al.*, 1987; Forrest *et al.*, 1988; Patino *et al.*, 1999a; Weening *et al.*, 1995). Demonstramos que o IFN- $\gamma$  incrementa a fidelidade do “splicing” e a estabilidade dos transcritos do gene *CYBB*, corrigindo parcialmente a expressão do componente gp91-*phox*, atenuando o fenótipo de X-DGC em uma família responsável ao IFN- $\gamma$  (Condino-Neto e Newburger, 2000, Ezekowitz *et al.*, 1987; Ishibashi *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 1998). Condino-Neto e colaboradores (1996) avaliaram o efeito do IFN- $\gamma$  sobre a produção de óxido nítrico em pacientes com DGC em uso desta medicação por seis meses, encontrando aumento na excreção urinário deste metabólito sem aumento na produção de óxido nítrico por células polimorfonucleares ou mononucleares. Ahlin e colaboradores (1999) demonstraram que neutrófilos de pacientes com DGC em tratamento com IFN- $\gamma$  humano recombinante apresentaram

aumento da capacidade de produção de óxido nítrico e redução do número de infecções, atribuído ao aumento da capacidade de produção de oxido nítrico pelos neutrófilos.

Os mecanismos moleculares que levam ao fenótipo clínico da DGC nos casos de mutações próximas aos sítios de “splicing”, interferindo com o processamento do RNA mensageiro e causando deleção de um ou mais exons não estão totalmente esclarecidos, da mesma maneira que o efeito benéfico do IFN- $\gamma$  sobre tais mecanismos, incluído o processamento da mensagem e estabilidade dos transcritos (Condino-Neto e Newburger, 2000; Condino-Neto e Newburger, 1998, Ishibashi *et al.*, 2001; Nuno *et al.*, 2004) As vias de processamento que ocorrem no núcleo apontam o mecanismo de “splicing” como um dos eventos mais importantes, no entanto este sistema dentro do grupo de pacientes que apresentam DGC ligada ao X não tem sido muito explorado. O presente estudo visa contribuir para o avanço do conhecimento sobre o uso do IFN- $\gamma$  como terapia para pacientes com DGC e mecanismos moleculares envolvidos na ativação de genes pelo IFN- $\gamma$  assim como o próprio mecanismo de “splicing”. No entanto outros mecanismos de terapia têm sido bastante estudados e descobertas importantes para tratamento da DGC têm sido identificadas, melhorando a qualidade de vida destes pacientes.

Em pacientes com DGC, faz-se uso de corticosteróides para o controle do desenvolvimento de granulomas inflamatórios, que causam obstrução da luz do trato gastrintestinal ou vias urinárias. A melhora clínica comumente é observada na primeira semana de tratamento dos pacientes que receberam Prednisona na dose de 2 mg/Kg/dia (Chin *et al.*, 1987; Collman e Dickerman, 1990; Danziger *et al.*, 1993).

Dentre as perspectivas de cura, no que pese a dificuldade imposta pela heterogeneidade das mutações que levam ao fenótipo de DGC, o programa de terapia gênica vem evoluindo e poderá ser aplicado a médio prazo (Roos e Curnutte, 1999; Dinauer *et al.*, 2000; Segal *et al.*, 2000; Johnston Jr., 2001). A terapia gênica tem sido estudada em modelos murinos de X-DGC e DGC autossômica e demonstra restauração da função do sistema NADPH oxidase em cerca de 50 a 80% dos neutrófilos de X-DGC e em 8 a 17% dos neutrofilos de DGC autossômica. MALECH e colaboradores (1999) apresentaram cinco pacientes adultos com A47-DGC submetidos a terapia gênica com melhora da função do sistema NADPH oxidase após o procedimento (Dinauer *et al.*, 2000; Malech *et al.*, 1997a; Malech *et al.*, 1997b).

Nosso grupo pretende implantar um novo protocolo de terapia gênica com base na ingestão de nanopartículas de glucana contendo os insertos selvagens. Este protocolo já foi testado com sucesso em modelos animais (dados não publicados).

Além do transplante convencional, com a mieloablação, tem sido realizado para estes pacientes o “mini-transplante”, em que a imunossupressão não acarreta mieloablação, apresentando dessa forma, resultados promissores (Horwitz *et al.*, 2001; Nagler *et al.*, 1999; Amrolia *et al.*, 2001), sendo esta, uma estratégia de correção fenotípica parcial de casos selecionados. Entretanto, os dois métodos não estão isentos de complicações, tanto na fase de indução de imunossupressão quanto após o transplante. Estudos de grupos de pacientes submetidos a ambos os tipos de tratamento demonstram que os resultados obtidos são melhores em crianças do que em adultos, e concordam que o procedimento deve ser realizado com doador HLA-idêntico (Horwitz *et al.*, 2001; Seger *et al.*, 2002).

A identificação do componente alterado e da mutação subjacente que levam às variadas manifestações clínicas são muito importantes, pois cada paciente com DGC e sua família têm potencialmente um defeito molecular específico. Isto é essencial para o aconselhamento genético adequado, terapêutica precoce e prevenção de seqüelas. O presente trabalho visou esclarecer alguns mecanismos moleculares pelo qual o IFN- $\gamma$  age no processamento da mensagem e estabilidade dos transcritos do gene *CYBB*.

## 2 JUSTIFICATIVA

O sistema NADPH oxidase das células fagocíticas apresentam um papel fundamental na defesa inata do hospedeiro contra as infecções, além de contribuir para o dano tecidual durante os processos inflamatórios crônicos. Portanto, a análise dos mecanismos moleculares que regulam a expressão e função deste sistema é de grande importância para a compreensão da fisiologia das células fagocíticas e de sua atividade microbicida.

Descrições de mutações próximas aos sítios de “splicing” que interferem com o processamento do RNA mensageiro, levando a deleção de um ou mais exons, são cada vez mais frequentes na literatura. Entretanto, os mecanismos moleculares que levam ao fenótipo clínico da DGC nestes casos nem sempre são esclarecidos, da mesma maneira que o efeito benéfico do IFN- $\gamma$  sobre tais mecanismos, incluído o processamento da mensagem e estabilidade dos transcritos (Condino-Neto e Newburger, 2000; Condino-Neto e Newburger, 1998, Ishibashi *et al.*, 2001; Nuno *et al.*, 2004). Com relação às várias reações de processamento que ocorrem no núcleo um dos eventos elegíveis para estudo é o “splicing” e modificações acerca das proteínas que compõem o spliceossoma, que para este grupo de pacientes com DGC podem trazer informações importantes não apenas sobre a terapia com IFN- $\gamma$  para pacientes com DGC como também informações sobre mecanismos moleculares envolvidos na ativação de genes pelo IFN- $\gamma$  assim como o próprio mecanismo de “splicing”.

Para tanto nos propomos a estudar o papel do IFN- $\gamma$  sobre o processamento da mensagem e estabilidade dos transcritos advindos de linhagens celulares obtidas de pacientes com X-DGC por defeito no “splicing”.



### **3 HIPÓTESE**

Nossa hipótese é que o IFN- $\gamma$  além de promover o aumento da expressão do gene *CYBB* e regular positivamente a NADPH oxidase, desempenha um efeito corretivo no processamento dos transcritos por mecanismos pré- e/ou pós-transcricionais. O IFN- $\gamma$  poderia influenciar o mecanismo de “splicing” dos pacientes que apresentam DGC induzindo modificações nas proteínas que compõem o spliceossoma.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito do IFN- $\gamma$  sobre eventos transcricionais relativos à expressão do gene *CYBB* em pacientes com DGC ocasionada por defeitos de “splicing”.

### 4.2 Objetivos Específicos

1 - Investigar o efeito do IFN- $\gamma$  *in vitro* sobre a liberação de superóxido por leucócitos do sangue periférico e linfócitos B imortalizados por EBV de pacientes com X-DGC por defeitos de “splicing” e pacientes com X-DGC por defeitos “nonsense” e controles sadios.

2 – Investigar o efeito do IFN- $\gamma$  *in vitro* sobre a expressão do gene *CYBB* em leucócitos do sangue periférico e linfócitos B imortalizados por EBV de pacientes com X-DGC por defeitos de “splicing”, comparados a pacientes com X-DGC por defeitos “nonsense” e controles sadios.

3 – Investigação do efeito do IFN- $\gamma$  sobre a expressão de proteínas do “spliciossomo” em células Hep2, células THP-1 da linhagem mielomonocítica humana, e células B imortalizadas com EBV de pacientes com X-DGC por defeitos de “splicing”.

## 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 Pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo foram diagnosticados de acordo com normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (Primary immunodeficiency diseases, 1999), World Health Organization (WHO) (World Health Organization, 1997), Grupo Panamericano de Imunodeficiência (PAGID) e Sociedade Européia de Imunodeficiências (ESID) (Conley *et al.*, 1999). Foram estudados cinco indivíduos com DGC do sexo masculino, que foram comparados a dois indivíduos saudáveis. Foram excluídos pacientes em utilização de medicamentos ou que foram submetidos a exposição prévia a medicamentos causadores de imunodeficiência celular ou humoral e pacientes menores de 10 anos de idade. Os pacientes selecionados foram encaminhados por apresentarem história de infecções de repetição, sugestivas de defeito fagocítico. Foram selecionados cinco pacientes (GCG, RVSS, VG, IC e MFB) cujo diagnóstico provável de DGC foi realizado por meio de testes bioquímicos, onde três desses pacientes foram confirmados com mutações nos sítios de “splicing”, sendo dois com mutações no Exon 3 (RVSS, GCG), um com mutação no Intron 9 (VG), um com mutação no Intron 10 (IC) e um (MFB) com mutação do tipo “nonsense” no Exon 3, como controle negativo.

Os pacientes menores de idade estiveram sempre acompanhados de pais ou responsáveis no momento da coleta e em todos os procedimentos clínicos e laboratoriais. A coleta de sangue ocorreu após o preenchimento do consentimento informativo por escrito sempre em pacientes sem infecções, imediatamente antes de receberem o tratamento terapêutico de IFN- $\gamma$ . Na admissão os pacientes com DGC responderam a um questionário padrão onde constam os antecedentes pessoais, enfocando principalmente processos infecciosos, doenças atópicas, doenças autoimunes, neoplasias e antecedentes familiares. Especialmente em relação às doenças atópicas, foram avaliados sintomas sugestivos de asma, rinite e/ou outras alergias, idade de início, fatores desencadeantes, frequência das crises, características da moradia e trabalho, medicações utilizadas e antecedentes familiares.

Todos os procedimentos aqui descritos não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo de acordo com a regulamentação da convenção de Helsinki para pesquisa com seres humanos e do Conselho Nacional de Saúde. Segue em anexo cópia da aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética (ANEXO A).

## **5.2 Obtenção de células**

Neutrófilos e células mononucleares foram separadas por gradiente de centrifugação utilizando-se dois gradientes distintos de densidade (Sigma Histopaque 1077 g/ml e 1119 g/ml, St. Louis EUA) (English e Andersen, 1974). Cerca de vinte ml de sangue foram coletados dos pacientes e um controle sadio através de punção de veias periféricas e transferidos para tubos plásticos (Costar) contendo 10 ml de ACD (anticoagulante), e em seguida acrescido com 15 ml de Dextran. Os tubos foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente para a decantação dos eritrócitos. A seguir, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo (Costar) e as células presentes nesse sobrenadante foram lavadas três vezes com solução Hank's, pH=7,4 a 1200 g durante 10 minutos. Após a última centrifugação, os leucócitos presentes no pellet de cada tubo foram ressuspensos em 6,0 ml de solução Hank's. Em seguida, um tubo novo foi preparado na seguinte ordem: 3,0 ml de Histopaque 1077 g/ml (fase inferior), 3 ml de Histopaque 1119 g/ml (interfase), e 6,0 ml da suspensão de leucócitos (fase superior). Esse tubo foi centrifugado a 1800 g durante 20 minutos a 4°C. Com o término da centrifugação, duas camadas distintas de diferentes populações de células ficaram visíveis, uma superior contendo mononucleares, e a inferior, contendo células polimorfonucleares. As células das respectivas camadas foram coletadas e separadas em tubos plásticos distintos, lavadas com solução Hank's a 1800 g durante 20 minutos a 4°C, e ressuspensas em volume final de 5,0 ml. Finalmente, as células foram contadas em câmara de Neubauer e sua viabilidade verificada pela utilização de Trypan blue (Sigma Chemical Co.).

### **5.3 Transformação de linfócitos B com vírus Epstein – Barr (EBV)**

As células obtidas por diferença de gradiente Histopaque 1077 g/ml, foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1650 completo [10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml)], e transferidas para placas de 12 poços. A cada poço foram acrescidos 500 µl da suspensão celular e 500 µl de suspensão contendo EBV, e as células foram mantidas em cultura em estufa a 37 °C com atmosfera de 10 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. A cada 48 horas foi realizada a troca de 1,0 ml de meio RPMI-1650 completo de cada poço contendo a cultura celular e EBV. Quando foi verificado o crescimento excessivo das células imortalizadas por EBV no interior dos poços, todo o volume de cada poço foi transferido para um frasco estéril de cultura de poliestireno de 50,0 ml (BD-Becton Dickinson, Sunnyvale, CA), realizando nesta etapa, a cada 48 horas, a troca do meio de cultura (Condino-Neto e Newburger, 1998). Os linfócitos B transformados expressam o citocromo *b<sub>558</sub>*, possuem atividade NADPH oxidase e reproduzem fielmente os defeitos bioquímicos e moleculares dos pacientes com DGC (Condino-Neto e Newburger, 2000; Condino-Neto e Newburger, 1998; Volkman *et al.*, 1984). Com isto, tivemos uma fonte células para os ensaios bioquímicos funcionais e de ácidos nucléicos dos pacientes para os estudos moleculares sem que houvessem repetidas coletas de sangue.

### **5.4 Cultura de linfócitos B imortalizados com EBV**

Após a transformação com EBV, linfócitos B foram cultivados em garrafas plásticas de 50,0 ml (BD-Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) contendo meio de cultura RPMI-1640 completo, numa densidade de 0,5-1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml a 37 °C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi monitorizada diariamente e a cultura mantida durante o estudo. Aliquotas das linhagens celulares foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, caso estudos adicionais sejam necessários. Quando necessário, os monócitos foram cultivados de maneira similar.

Para os nossos estudos com células B imortalizadas com EBV não foram realizadas novas coletas de sangue devido a dificuldades de acesso aos pacientes, sendo utilizadas células criopreservadas em nosso laboratório dos pacientes RVSS, GCG, MF e de controles sadios.

### **5.5 Tratamento com IFN- $\gamma$ *in vitro* e *ex vivo***

Linfócitos B transformados com EBV, monócitos, células das linhagens Hep-2 ou Thp1 foram cultivados com IFN- $\gamma$  (100 U/ml ou 10 U/ml, R&D Systems) em placas estéreis de 06 poços ou garrafas estéreis de 25 cm<sup>3</sup> durante dois dias, e neutrófilos por apenas uma hora (1000 U/ml, R&D Systems). O IFN- $\gamma$  foi escolhido porque é um importante indutor dos genes que codificam componentes do sistema NADPH oxidase (Jacobsen e Skalnik, 1999), além de ser utilizado na terapia de pacientes com DGC (Woodman *et al.*, 1992), ao passo que linfócitos B e monócitos têm receptores e mecanismos de transdução bem caracterizados para esta citocina (Jouanguy *et al.*, 1997). Após o término do tempo de incubação de cada experimento, as células foram recuperadas através da utilização de PBS 1x gelado, sendo as células recuperadas após centrifugação a 1800 rpm durante 5 minutos a 4 °C. A seguir as células foram ressuspensas em tampão Hank's, para dosagem de liberação de superóxido, ou Trizol, para extração de RNA.

### **5.6 Dosagem de Ânion Superóxido**

A dosagem de ânion superóxido liberado pelos neutrófilos e células mononucleares dos pacientes e controle sadio foi utilizada como metodologia diagnóstica de pacientes com suspeita de DGC, conforme protocolo publicado e modificado por Condino-Neto e colaboradores (Condino-Neto, *et al.*, 1993; Condino-Neto *et al.*, 1996; McCord e Fridovich, 1969). Esta metodologia também foi utilizada

para avaliar a ocorrência de modificações no burst oxidativo após o uso de IFN- $\gamma$  comparando este resultado com células não tratadas.

Células mononucleares e neutrófilos do paciente VG e de controle sadio, e linfócitos B imortalizados com EBV dos pacientes GCG RVSS e MF e controles sadios foram ressuspensas a uma concentração final  $2 \times 10^6$  células/ml, e incubadas com PMA (30 nm) na presença de citocromo c (80  $\mu$ M), durante 60 minutos a 37 °C. A reação com liberação espontânea foi avaliada utilizando-se solução de Hank's ao invés de PMA. Metade dos tubos, estimulados e espontâneos, continham superóxido dismutase (SOD, 90 U/ml) no início do experimento, como controle da redução inespecífica do citocromo c. Depois do tempo de incubação, a reação foi interrompida, com posterior adição de SOD aos tubos que não continham SOD. A seguir os tubos foram centrifugados a 2200 g durante 15 minutos a 4 °C, sendo avaliada a absorvância dos sobrenadantes em comprimento de onda de 550 nm. A produção de ânion superóxido foi calculada usando-se um coeficiente de extinção de  $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e os resultados expressos em nmols/ $10^6$ /hora. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os experimentos realizados com células mononucleares e neutrófilos foram realizados apenas com o paciente VG devido à dificuldades encontradas para a realização de coleta de sangue dos outros pacientes além da necessidade de realizar o ensaio logo a seguir da coleta do sangue. O presente paciente posteriormente faleceu e ficamos impossibilitados de aumentar o número de ensaios para que se fosse possível realizar análises estatísticas. Para os ensaios que utilizaram linfócitos B imortalizados com EBV utilizou-se células criopreservadas, que passaram por um processo de descongelamento e de estabilização de cultura celular para que fossem posteriormente utilizados no ensaio.

## **5.7 Extração do RNA total**

Para que se pudesse realizar a análise qualitativa e semiquantitativa dos transcritos e quantificação da expressão gênica foram extraídos RNAs das culturas de células mononucleares e neutrófilos do paciente VG e de indivíduos sadios, e de

linfócitos B imortalizados com EBV dos pacientes RVSS, GCG, MF e de controles sadios.

Cerca de  $1,0 \times 10^7$  células foram ressuspensas em 1,0 mL de Trizol e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtenção de RNA total. Posteriormente foram adicionados a cada tubo 200  $\mu$ L de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas durante 2 a 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, a fase aquosa contendo RNA foi transferida a um novo tubo e 500  $\mu$ L de isopropanol foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas 45 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas como descrito anteriormente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA ressuspenso em 1,0 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 g durante 5 minutos a 4 °C. O etanol foi retirado cuidadosamente e o RNA diluído em 30  $\mu$ L de água livre de DNases e RNases. Depois de incubação durante 12 horas a 4 °C a leitura da concentração do RNA foi feita por espectrofotometria numa diluição de 1 em 50 a  $\lambda = 260$  nm.

## 6.8 Obtenção de RNA

Células cultivadas em garrafas de poliestireno (BD-Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) ou obtidas a partir de células de sangue periférico, foram submetidas à extração do RNA total pelo método recomendado pelo fabricante do reagente TRIZOL (GIBCO BRL). Em seguida as amostras foram quantificadas por espectroscopia em comprimento de onda de 260 e 280 nm, e armazenados à - 80 °C até seu uso para conversão em cDNA. Os valores da absorbância obtidos foram convertidos em  $\mu$ g/ $\mu$ l através da fórmula: absorbância (260 nm) x diluição x 0,04 = concentração de RNA total.



## 5.9 Transcrição Reversa (RT)

As amostras de RNA foram submetidas à reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA pela utilização do “kit SuperScript III RT” (GIBCO BRL) utilizando-se 2 µl de Randon primer (hexâmeros randômicos – 50 µM), 2 µl de tampão RT (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM e MgCl<sub>2</sub> 10 mM), 4 µl de dNTP's (dATP, dCTP, dTTP e dGTP – 2,5 mM), 1 µl de enzima M-MuLV-RT (100 U/µl), e 1 µl de inibidor de Rnase (10 U/µl). A seguir a solução foi incubada durante 60 minutos a 42 °C, e em seguida por 10 minutos a 92 °C para inativação da enzima transcriptase reversa. As amostras foram armazenadas a – 20 °C até o momento do uso. O cDNA é uma molécula mais estável e podendo ser armazenada sem degradação por mais tempo que o RNA.

## 5.10 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Para as reações de PCR foram utilizados 1 µl de cDNA, das células B imortalizadas com EBV dos pacientes RVSS, GCG, MF e de controles sadios resultantes do item anterior [*Transcrição Reversa (RT)*] em solução final de 50 µl, contendo tampão PCR (Tris 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), dNTP's (dATP, dCTP, dTTP e dGTP – 2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM). Para cada expressão de proteína em estudo em reações distintas (*gp91-phox* e *p47-phox*) foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos (par de primer – 400 nM cada), 1 U de enzima polimerase (*Thermus aquaticus* – Taq) e água livre de nucleases. As reações foram feitas em 30 ciclos em termociclador Perkin Elmer modelo 2400.

Esta técnica nos permite fazer uma análise qualitativa e semiquantitativa dos transcritos após o uso da técnica de eletroforese em gel, que possibilita a visualização das bandas identificando padrões de bandas diferenciados. A análise semiquantitativa foi realizada através de programas computacionais específicos.

## 5.11 Eletroforese em Gel

Os produtos da amplificação do cDNA obtidos como descrito acima [*Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)*], foram identificados em gel de agarose a 2% no tampão TAE, na presença de brometo de etídio 1µg/ml, identificando-se os fragmentos do tamanho esperado. Em alguns casos, foi utilizado o gel com Agarose Nu-Sieve a 3% ou gel de poliacrilamida a 6% para maior resolução e sensibilidade. As bandas foram analisadas utilizando o Image Master Software (Amersham Pharmacia Biotech).

## 5.12 Real time PCR

Para este ensaio quantitativo as amostras de RNA total de células B transformadas por EBV dos pacientes RVSS, GCG, MF e de controles sadios e células mononucleares e neutrófilos do paciente VG e de indivíduos sadios ( $5 \times 10^6$  células/ml) foram preparadas através do uso do reagente TRIZOL. O cDNA foi obtido utilizando-se o kit SuperScript II RT (GIBCO BRL). Para a reação usou-se 2 µg de RNA total, hexâmeros randômicos e (MMLV-RT). O cDNA foi ampliado por meio de PCR em tempo real, através do sistema SYBR Green Real Time (Applied Biosystems). O SYBR® Green se une especificamente a DNA de dupla fita e em estado de excitação emite luz. Deste modo, quanto mais um produto é acumulado, maior é a fluorescência. Isto permitiu correlacionar à intensidade de sinal coletado com a quantidade de produto amplificado (Giulietti *et al.*, 2001). O gene escolhido para controle interno da reação foi o gene da  $\beta$ -Actina (NM 001101). A concentração utilizada foi de 300 nM para o primer de  $\beta$ -actina, 600 nM para os primers de gp91-*phox* e 5 ng para as amostras de cDNA. Os ciclos utilizados na reação foram Stage1 – 50 °C durante 2 minutos, Stage2 – 95 °C durante 10 minutos e Stage3- 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto repetido em 40 ciclos. O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra segundo as condições descritas.

### **5.13 Imunofluorescência Indireta (IFI) para Detecção de Proteínas do Spliceossoma**

Na técnica de imunofluorescência indireta, as amostras utilizadas (células Thp1, Hep-2 e linfócitos B imortalizados com EBV), como substrato antigênico, foram incubadas com autoanticorpos contra proteínas nucleares e os anticorpos não reagentes foram retirados por lavagem. O substrato marcado com autoanticorpos foi incubado com o conjugado específico marcado com fluoresceína e o reagente excedente retirado por lavagem. Quando observadas através de um microscópio de fluorescência, as amostras positivas com autoanticorpos exibiram fluorescência verde correspondendo às áreas da célula ou do núcleo onde se ligaram os autoanticorpos.

Na preparação das lâminas, células de cultura Hep-2 ou Thp1 e linfócitos B imortalizados com EBV tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$  (10 U/ml e 100 U/ml para as Hep2 e apenas 100 U/ml para as Thp1) durante 2 dias foram colocadas para crescimento e adesão em lamínulas no caso das Hep2, e em lâminas no caso das Thp1 e linfócitos B imortalizados com EBV, e posteriormente fixadas e permeabilizadas com Metanol e Acetona. As lamínulas ou lâminas foram rotuladas, colocadas em câmara úmida sendo adicionada 1 gota (40-50 $\mu$ l) do soro controle negativo (obtido a partir de indivíduos saudáveis com ausência de detecção de autoanticorpos contra proteínas do spliceossoma e proteínas ribossomais) diluído em PBS [1:160], soro com marcação positiva e apresentando o padrão SSA/Ro+ diluído em PBS [1:160], soro com marcação positiva e apresentando o padrão sm-RNP+ diluído em PBS [1:160] e soro com marcação positiva e apresentando o padrão sm-RNP+ diluído em PBS [1:640] em triplicata para ambos os grupos (células tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$ ). A escolha destes padrões se deve ao fato da marcação identificar proteínas ribossomais nucleares e spliceossomais que são importantes para a análise da influência do IFN- $\gamma$  sobre o mecanismo de splicing. Em seguida as lamínulas ou lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente as lamínulas ou lâminas foram lavadas com PBS. Colocou-se as lamínulas ou lâminas de volta na câmara úmida e imediatamente cobriu-se cada uma delas com uma gota de conjugado fluorescente (anti-IgG humano marcado com FITC), e as lamínulas foram incubadas por mais 30 minutos, com posterior lavagem. Após este procedimento aplicou-se o meio de montagem de lâminas numa linha contínua entre

uma extremidade a outra da lâmina. Desprezou-se o excesso de tampão PBS e encostou-se a borda inferior da lamínula na borda da lâmina. Suavemente baixou-se a lamínula em direção à lâmina de modo que o meio de montagem fluísse pela lâmina sem formação de bolhas de ar. Os padrões de Fatores Anti-Núcleo (FAN) de IFI foram montados para as lâminas dos grupos tratados e não tratados com IFN- $\gamma$ . Para que os resultados dos testes fossem considerados válidos, os critérios a seguir foram observados: os padrões FAN devem ser  $\geq 3+$ ; e o controle negativo de IFI deve ser negativo, exceto para linfócitos B imortalizados com EBV. Finalmente, as lâminas de FAN foram levadas ao microscópio de fluorescência e os padrões de fluorescência analisados por no mínimo dois observadores.

#### **5.14 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o uso do programa PRISM GraphicPad10. Os dados foram submetidos à análise exploratória, com cálculo da média, desvio padrão, mediana, percentis e distribuição amostral. Os testes paramétricos ou não paramétricos foram aplicados conforme o caso (Bhattachryya e Johnson, 1977). Para todos os testes, adotou-se como nível de significância 0,05 ( $\alpha=5\%$ ), onde os valores descritivos (p) abaixo desse valor foram considerados significantes.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização Clínica e Laboratorial dos Pacientes

Os pacientes incluídos nesse estudo apresentam defeitos moleculares já identificados no componente gp91-*phox* do sistema NADPH (Agudelo-Flórez, 2006), e através dos resultados obtidos em questionário prévio, foi possível estabelecer o tempo de surgimento dos sintomas clínicos da doença (ANEXO B, Fig. A).

Analisando as taxas de hemoglobinas no sangue, foi observado que os pacientes apresentaram uma quantidade inferior em relação aos valores normais (ANEXO B, Fig. B), ocorrendo o mesmo com os valores de hematócrito (ANEXO B, Fig. C) (ANEXO C).

Em relação à quantidade de leucócitos totais no sangue periférico, pôde-se verificar que o paciente GCG apresentou valores abaixo da média e os outros pacientes, acima da média normal na população (ANEXO B, Fig. D). Na contagem de linfócitos totais e sub-populações linfocitárias, o paciente RVSS apresentou valores acima dos considerados normais para linfócitos totais, células CD4+ e CD8+, os pacientes GCG, MF e VG apresentaram valores baixos para células CD4+, os pacientes GCG e VG apresentaram valores baixos para células CD8+ e o paciente MF, valores normais (ANEXO B, Fig. E) (ANEXO C).

Dentre os pacientes que tivemos acesso aos dados laboratoriais, apenas dois foram avaliados quanto à presença de proteínas do complemento, apresentando valores considerados normais (ANEXO B, Fig. F, Fig. G; ANEXO C).

Em relação às imunoglobulinas séricas (IgA, IgG e IgM), pôde-se nota-se a presença de valores acima da média da população na respectiva faixa etária (ANEXO B; Figs. H, I, J; ANEXO C).

Os ensaios de fagocitose nos pacientes com DGC apresentaram valores estatísticos normais quando comparado ao grupo controle (ANEXO B; Fig. K), ao passo que o ensaio funcional de atividade dos espécimes reativos do oxigênio através do NBT demonstrou uma diferença estatística significativa entre o grupo de pacientes com DGC e grupo controle (ANEXO B, Fig. L).

O Paciente IC não foi incluído na caracterização clínica e laboratorial, pois não tivemos acesso aos seus achados clínicos.

Através de ensaios de seqüenciamento molecular, foi possível identificar as alterações moleculares de cada paciente (Tabela I, Agudelo-Florez *et. al*, 2006).

**Tabela 1:** Mutações no gene *CYBB* identificadas em quatro pacientes com DGC.

Paciente	Tipo de Mutação	Posição	Substituição	Produto	Referência
RVSS	“Splicing”	Exon 3	c.264 G>A	Deleção do Exon 3	ANEXO D
GCG	“Splicing”	Exon 3	c.264 G>A	Deleção do Exon 3	ANEXO D
VG	“Splicing”	Intron 9	c.1164 – 2 A>G	Deleção do Exon 10	ANEXO E
IC	“Splicing”	Intron 10	c.1326+1G>A	Deleção do Exon 10	ANEXO F
MF	“Stop-codon”	Exon 3	c.219 C>T	Código de parada no Exon 3	ANEXO G

## 6.2 Liberação de superóxido antes e após o tratamento com IFN- $\gamma$ em células polimorfonucleares, mononucleares e linfócitos B imortalizados

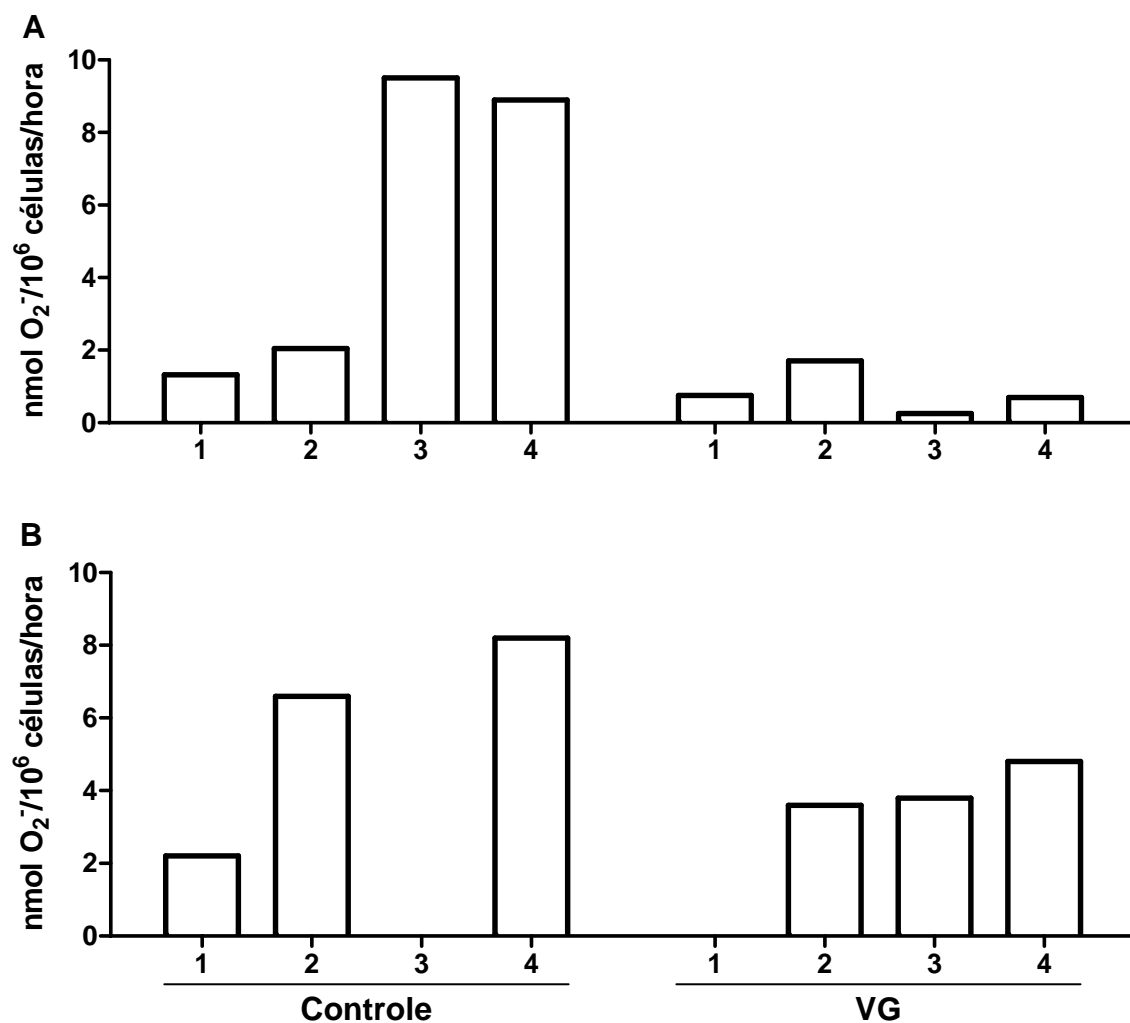
O estudo da função do sistema NADPH oxidase foi realizado utilizando-se células polimorfonucleares e mononucleares de indivíduos normais e do paciente VG (Fig. 2) e linfócitos B-EBV de indivíduos normais e pacientes GCG, RVSS e MF (Fig. 3). Tratamos as células polimorfonucleares com IFN- $\gamma$  na concentração de 1000U/ml por 1 hora, as células mononucleares na concentração de 100U/ml por 12 horas e os linfócitos B imortalizados com EBV na concentração de 100U/ml por 48 horas.

Os ensaios demonstraram importante déficit na liberação de ânion superóxido após estímulo com PMA nas células dos pacientes com DGC por defeito de “splicing” no gene *CYBB*, com melhora de resposta após estímulo com IFN- $\gamma$ .

Utilizamos apenas as células polimorfonucleares e mononucleares do paciente VG devido ao fato de termos encontrado dificuldades para a obtenção de amostras de sangue dos outros pacientes. Também não podemos utilizar amostras do paciente VG para os ensaios com células B-EBV, pois não possuíamos ampolas congeladas deste paciente em nosso laboratório e com a amostra de sangue que obtivemos deste paciente demos prioridade aos ensaios com células polimorfonucleares e mononucleares.

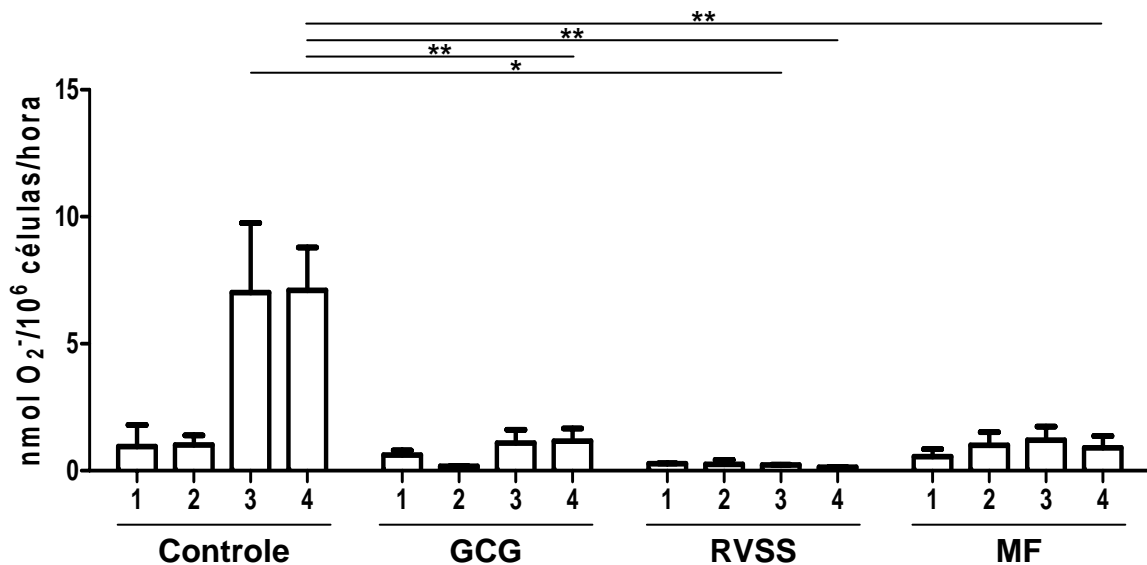
Quando comparada a liberação de ânion superóxido pelas células polimorfonucleares e mononucleares ativadas e não ativadas com PMA, observamos diferenças na atividade NADPH oxidase entre os grupos tratados e não tratados com IFN- $\gamma$  no paciente estudado e indivíduos saudáveis (Figs. 2 e 3). No grupo controle houve uma melhora na produção de ânion superóxido tanto no grupo não estimulado com PMA (PMN sem IFN- $\gamma$ : 1,32 PMN com IFN- $\gamma$ : 2,05 - mononuclear sem IFN- $\gamma$ : 2,2 mononuclear com IFN- $\gamma$ : 6,6 nmol/10<sup>6</sup>/hora) quanto no grupo estimulado (PMN sem IFN- $\gamma$ : 9,5 PMN com IFN- $\gamma$ : 8,9 - mononuclear sem IFN- $\gamma$ : 0,0 mononuclear com IFN- $\gamma$ : 8,2 nmol/10<sup>6</sup>/hora). No paciente VG houve uma melhora na produção de ânion superóxido tanto no grupo não estimulado com PMA (PMN sem IFN- $\gamma$ : 0,75 PMN com IFN- $\gamma$ : 1,7 - mononuclear sem IFN- $\gamma$ : 0,0 mononuclear com IFN- $\gamma$ : 3,6 nmol/10<sup>6</sup>/hora) quanto no grupo estimulado (PMN sem IFN- $\gamma$ : 0,26 PMN com IFN- $\gamma$ : 0,7 - mononuclear sem IFN- $\gamma$ : 3,8 mononuclear com IFN- $\gamma$ : 4,9 nmol/10<sup>6</sup>/hora). Não pudemos fazer análises estatísticas destes resultados devido ao fato de dispormos de células de apenas um paciente e pela dificuldade de coleta de sangue para a realização deste ensaio.

Os ensaios de liberação de ânion superóxido em linfócitos B imortalizados foram realizados tendo sempre dois indivíduos saudáveis e três pacientes com defeito de “splicing” no componente gp91-*phox*. Estes experimentos foram repetidos quatro vezes para cada paciente estudado. Pudemos constatar melhora na produção de anion superóxido após tratamento com IFN- $\gamma$  no grupo controle não estimulado (sem IFN- $\gamma$ : 0,96 com IFN- $\gamma$ : 1,01 nmol/10<sup>6</sup>/hora) e estimulado com PMA (sem IFN- $\gamma$ : 7,02 com IFN- $\gamma$ : 7,11 nmol/10<sup>6</sup>/hora), no paciente GCG estimulado com PMA (sem IFN- $\gamma$ : 1,09 com IFN- $\gamma$ : 1,16 nmol/10<sup>6</sup>/hora) e no paciente MF não estimulado com PMA (sem IFN- $\gamma$ : 0,55 com IFN- $\gamma$ : 1,01 nmol/10<sup>6</sup>/hora). Os resultados com diferenças significantes ( $p < 0,01$ ) foram encontrados quando comparamos: controle estimulado com PMA com RVSS estimulado com PMA; quando comparamos controle com PMA + IFN- $\gamma$  e GCG com PMA + IFN- $\gamma$ , RVSS com PMA + IFN- $\gamma$  e MF com PMA + IFN- $\gamma$ , no entanto não notamos diferenças significativas nos pacientes entre grupos tratados e não tratados com IFN- $\gamma$ . Para analisar os resultados deste ensaio utilizamos o ANOVA seguido do teste de Turkey, sendo considerados valores significativos os menores que 0,05.



**Figura 2. Liberação de superóxido por células polimorfonucleares e mononucleares.** Em (A) estão representados os valores encontrados para células polimorfonucleares de controle normal e paciente VG (apresenta defeito de “splicing” no componente gp91-*phox*), e em (B) para as células mononucleares de controle normal e paciente VG. A liberação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> foi mensurado nas seguintes condições: espontâneo (1), espontâneo + IFN- $\gamma$  ([1000U/ml] por 1h para polimorfonucleares, e [100U/ml] por 12h para mononucleares) (2), estimulado com PMA (3), estimulado com PMA + IFN- $\gamma$  (4).



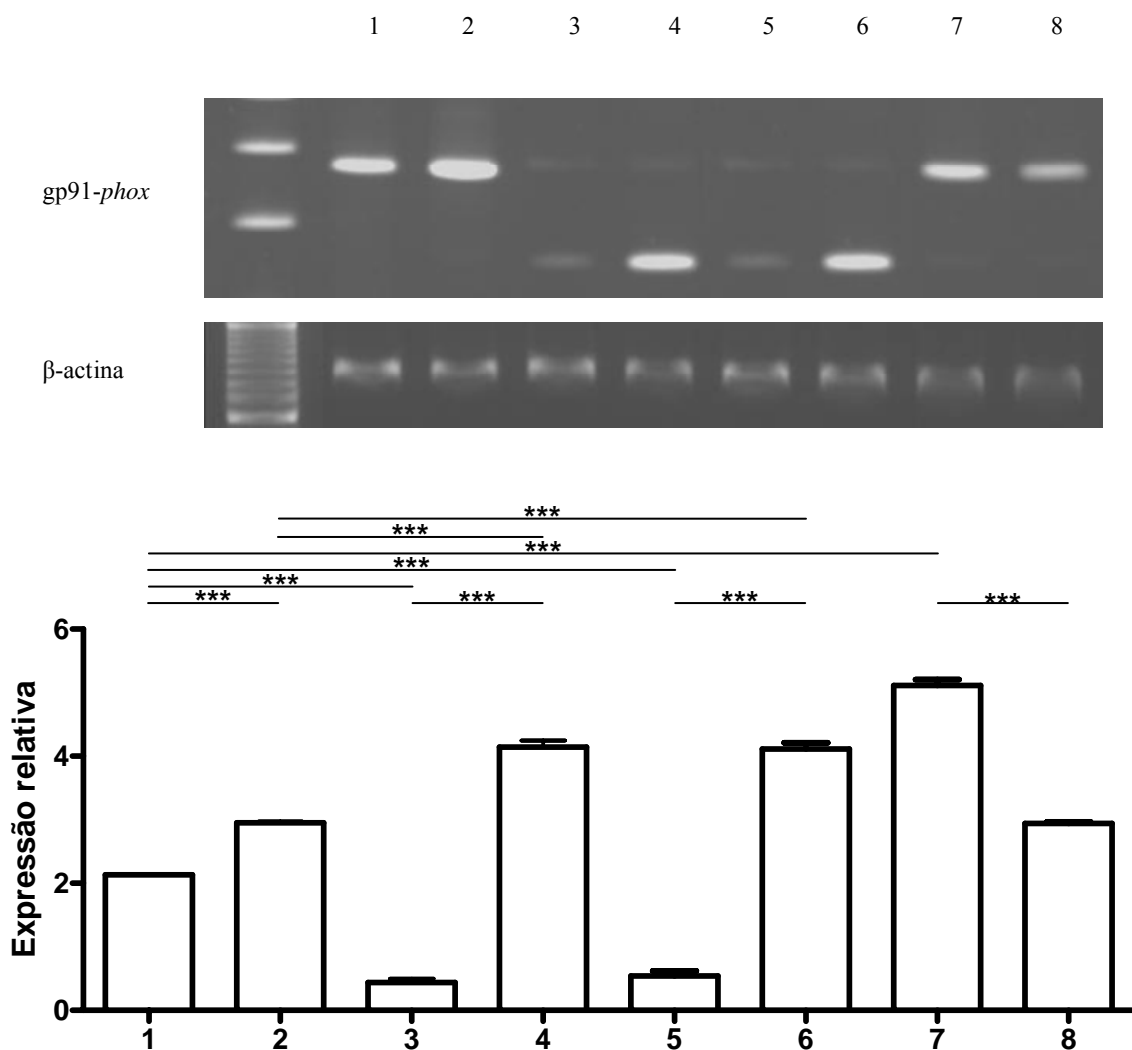


**Figura 3. Liberação de superóxido por linfócitos B imortalizados de controle normal e pacientes com defeitos de “splicing” no componente *gp91-phox*.** A liberação de  $O_2^-$  foi mensurada em indivíduos saudáveis (controle) e nos pacientes GCG, RVSS e MF nas seguintes condições: espontâneo (1), espontâneo + IFN- $\gamma$  ([1000U/ml] por 1h para polimorfonucleares, e [100U/ml] por 12h para mononucleares) (2), estimulado com PMA (3), estimulado com PMA + IFN- $\gamma$  (4). Os valores representados indicam a média encontrada nos experimentos (n=4), e os valores encontrados com diferenças estatísticas significativas estão representados com asteriscos (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 6.3 PCR para detecção de transcritos antes e após o tratamento com IFN- $\gamma$

Os ensaios de PCR pré e pós tratamento com IFN- $\gamma$  demonstraram diferenças no padrão de bandas dos produtos de amplificação da região compreendida entre os Exons 2-4 com os primers (Forward - 5'- cagcctgcctgaatttcaac - 3'; e Reverse - 5'- cactggaaccctgaggaag - 3'). Entre indivíduos normais e paciente MF (bandas maiores) e pacientes GCG e RVSS (bandas menores) devido às suas características moleculares particulares (n = 3). Através da análise da expressão relativa constatamos após o tratamento com IFN- $\gamma$  nota-se um aumento da expressão da *gp91-phox* tanto em indivíduos normais (sem IFN- $\gamma$  2,13, com IFN- $\gamma$  2,96) quanto nos pacientes com X-DGC ocasionada por defeitos de “splicing” (GCG: sem IFN- $\gamma$  0,44, com IFN- $\gamma$  4,15; RVSS: sem IFN- $\gamma$  0,54, com IFN- $\gamma$  4,11), e no paciente MF (sem IFN- $\gamma$  5,11, com IFN- $\gamma$  2,94) houve redução desta expressão. As diferenças encontradas entre células tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$  assim como as diferenças encontradas entre células não

tratadas dos indivíduos saudáveis e células não tratadas dos pacientes GCG, RVSS e MF e entre células tratadas do controle e células tratadas dos pacientes GCG e RVSS foram consideradas significativas ( $p < 0,001$ ) após análise estatística (ANOVA seguido de teste de Turkey) (Fig. 4).



**Figura 4. Análise RT-PCR da expressão gênica da gp91-phox antes e após o tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  em linfócitos B transformados com EBV de controle e pacientes DGC ligados ao X:** Gel de eletroforese de agarose (2%) representativa de produtos de PCR corados com Brometo de Etídio. Os produtos mostrados para a gp91-phox, na fotografia superior, mostram a amplificação da região compreendida entre os Exons 2-4 com os primers (Forward - 5'- cagcctgcctgaattcaac - 3'; e Reverse - 5'- cactggaaccctgaggaag - 3'). Marcador de peso molecular (100 bp); Linhas 3, 5 e 7, GCG, RVSS e MF. Linhas 4, 6 e 8 GCG, RVSS e MF tratados com IFN- $\gamma$ . GCG e RVSS apresentam produtos menores devido aos seus defeitos moleculares particulares. Em todos os indivíduos foi observado um aumento da expressão relativa do gene gp91-phox com o tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$ , exceto MF. A expressão gênica esperada da  $\beta$ -actina foi detectada em todas as amostras. O painel inferior mostra a média da densitometria das bandas da expressão da gp91-phox (n = 3). Os valores representados indicam a média encontrada nos experimentos e os valores que apresentaram diferenças estatísticas estão representados com asteriscos (\*\*\*) p < 0,001).

#### 6.4 Real-Time PCR para gp91-*phox*

A quantificação do nível de expressão dos transcritos do *CYBB* (gp91-*phox*) foi realizada com células polimorfonucleares e mononucleares de indivíduos saudáveis e pacientes VG e MF, em células Thp1 e em linfócitos B-EBV de indivíduos saudáveis e pacientes GCG, RVSS e MF. Tratamos as células polimorfonucleares com IFN- $\gamma$  na concentração de 1000U/ml por 1 hora, as células mononucleares na concentração de 100U/ml por 12 horas e as células Thp1 e linfócitos B imortalizados com EBV na concentração de 100U/ml por 48 horas e através da técnica de incorporação de SYBR® Green quantificamos a expressão dos transcritos do *CYBB* (n = 3) (Fig. 5) e para a análise estatística utilizamos ANOVA seguido de teste de Turkey.

Através da quantificação foi possível notar uma expressão gênica diferenciada entre pacientes com DGC e indivíduos saudáveis (Fig 5 A, B e C). Em células polimorfonucleares os níveis de expressão encontrados foram maiores que os encontrados para células mononucleares, células Thp1 e linfócitos B-EBV.

Em células polimorfonucleares (Fig. 5A), as células de indivíduos saudáveis (sem IFN- $\gamma$ : 1,01, com IFN- $\gamma$ : 35,99) (Fig. 5A, linhas 1 e 2) e do paciente VG (sem IFN- $\gamma$ : 3,67, com IFN- $\gamma$ : 5,31) (Fig. 5A, linhas 3 e 4) apresentaram expressão relativa aumentada quando são tratadas com IFN- $\gamma$ , sendo que nos indivíduos saudáveis este aumento foi maior que o encontrado no paciente VG. No paciente MF (Fig. 5A, linhas 5 e 6) observou-se uma diminuição da expressão (sem IFN- $\gamma$ : 29,96, com IFN- $\gamma$ : 24,76). Comparações entre tratamentos e entre indivíduos foram realizadas e diferenças estatísticas ( $p < .0,001$ ) foram encontradas entre controle, VG e MF quando estes eram tratados e não tratados com IFN- $\gamma$ ; entre indivíduos saudáveis não tratados com IFN- $\gamma$  e VG e MF também não tratados com IFN- $\gamma$ ; e entre indivíduos saudáveis tratados com IFN- $\gamma$  e VG e MF também tratados com IFN- $\gamma$ .

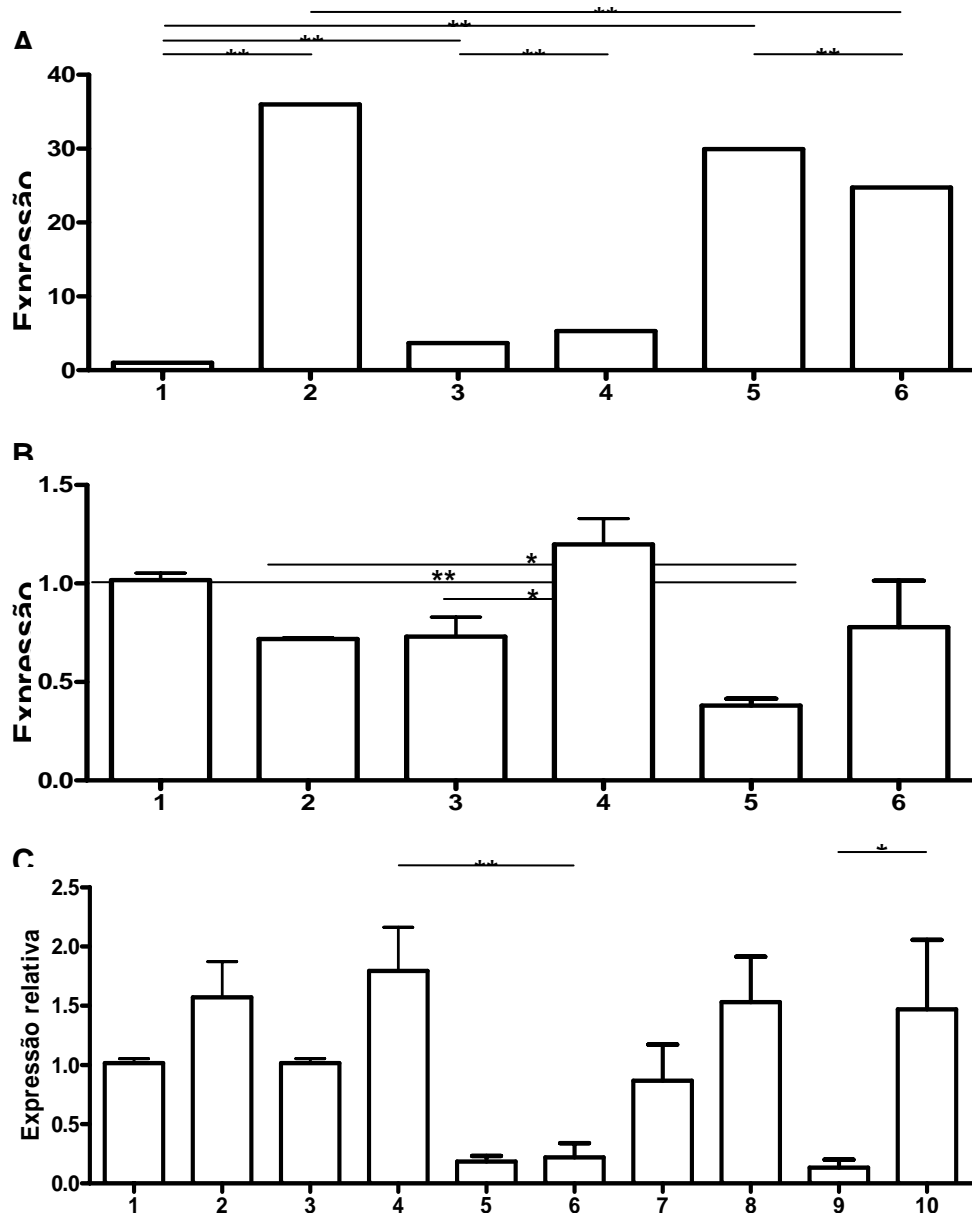
Em células mononucleares (Fig. 5B), o paciente VG (sem IFN- $\gamma$ : 0,73, com IFN- $\gamma$ : 1,2) (Fig. 5B, linhas 3 e 4) e o paciente MF (sem IFN- $\gamma$ : 0,38, com IFN- $\gamma$ : 0,78) (Fig. 5B, linhas 5 e 6) possuíam expressão relativa aumentada quando tratadas com IFN- $\gamma$ , sendo os valores encontrados para o paciente VG maiores que os encontrados no paciente MF. Nas células de indivíduos saudáveis (Fig. 5B, linhas 1 e 2) observou-se uma diminuição da expressão (sem IFN- $\gamma$ : 29,96, com IFN- $\gamma$ : 24,76). Foram realizadas

comparações entre tratamentos e entre indivíduos e não foram encontradas diferenças significativas.

Em células Thp1 e em linfócitos B-EBV (Fig. 5C), pode-se notar que há um aumento da expressão do *CYBB* em todas as células utilizadas neste ensaio quando estas são tratadas com IFN- $\gamma$ . Níveis similares de expressão da *gp91-phox* são encontrados em células Thp1 (sem IFN- $\gamma$ : 1,02, com IFN- $\gamma$ : 1,57) (Fig. 5C, linhas 1 e 2), controle (sem IFN- $\gamma$ : 1,02, com IFN- $\gamma$ : 1,79) (Fig. 5C, linhas 3 e 4), RVSS (sem IFN- $\gamma$ : 0,87, com IFN- $\gamma$ : 1,53) (Fig. 5C, linhas 7 e 8) e MF (sem IFN- $\gamma$ : 0,13, com IFN- $\gamma$ : 1,47) (Fig. 5C, linhas 9 e 10). O paciente GCG apresentou os menores níveis de expressão gênica (sem IFN- $\gamma$  0,19, com IFN- $\gamma$  2,2) (Fig. 5C, linhas 5 e 6), entretanto somente foram encontradas diferenças estatísticas entre as células de indivíduos saudáveis tratadas com IFN- $\gamma$  e células do paciente GCG tratadas com IFN- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) e entre células tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$  do paciente MF ( $p < 0,05$ ).

Devido a dificuldade de acesso às amostras de sangue dos pacientes GCG e RVSS não pudemos avaliar a expressão gênica para a *gp91-phox* em células polimorfonucleares e células mononucleares. E devido ao escasso material colhido do paciente VG e à prioridade dada aos ensaios de produção de ânion superóxido não foi possível realizar os ensaios de expressão gênica para a *gp91-phox* para este paciente.

Em células polimorfonucleares, células mononucleares e em linfócitos B-EBV é perceptível que os níveis de expressão apresentaram uma tendência em ser diferente entre pacientes com mutações diferentes, entre pacientes que apresentam mesma mutação e até mesmo entre populações celulares distintas do mesmo paciente, isto sugere que algum outro sistema possa estar sendo envolvido na expressão gênica e/ou regulação da expressão do *CYBB* possa se mostrar afetado por esta indução pelo IFN- $\gamma$ . De forma alternativa partimos para avaliar o sistema das proteínas do spliceossoma.



**Figura 5. Quantificação relativa da expressão do gene da gp91-phox:** em (A) células polimorfonucleares, em (B) células mononucleares, em (C) células Thp1 e linfócitos B imortalizados com vírus Epstein-Barr. Em (A) e (B) as linhas 1 e 2 representam a expressão espontânea pós tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  em indivíduos saudáveis, as linhas 3 e 4 representam a expressão espontânea pós tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  nas células do paciente VG e as linhas 5 e 6 representam a expressão espontânea pós tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  nas células do paciente MF. Em (C) as linhas 1 e 2 representam respectivamente a expressão espontânea e pós tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  em células da linhagem Thp1, as linhas 3 e 4 representam a expressão espontânea e pós tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  em indivíduos saudáveis, as linhas 5 e 6 representam a expressão espontânea e pós tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  nas células do paciente GCG, as linhas 7 e 8 representam a expressão espontânea e pós tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  nas células do paciente RVSS e as linhas 9 e 10 representam a expressão espontânea e pós tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  nas células do paciente MF. Os resultados nos gráficos representam a média encontrada nos experimentos (n=3) e a análise estatística utilizada foi o ANOVA seguido de teste de Turkey (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001)

## 6.5 Efeito do IFN- $\gamma$ sobre proteínas do spliceossomo marcadas com fluorescência

Através da marcação de proteínas do spliceossomo foi possível visualizar um aumento da fluorescência além de modificações no padrão de coração das células aderentes Hep-2 após o tratamento com IFN- $\gamma$ , o Corpo de Cajal fica menos intenso e menos compacto, começa a haver extravasamento de antígeno para o citoplasma, há um “empacotamento” da marcação celular, e há algumas células com um aspecto rendiculado. Nota-se também que o IFN- $\gamma$  estimula o aparecimento de células com uma distribuição de antígeno estranha, em provável apoptose, além de células com uma formação “cabeça de alfinete” e com o tratamento com 100U de IFN- $\gamma$  ambos tipos celulares tornam-se ainda mais freqüente (Tabela 2). Constatando assim que o IFN- $\gamma$  está alterando a quantidade e distribuição do antígeno nas células Hep-2.

Nas células Thp1, nota-se que o antígeno marcado com Sm-RNP já é naturalmente frouxo e com aspecto grumado e o tratamento com IFN- $\gamma$  torna a marcação SSA/Ro mais espalhada com aspecto mais pontilhado. Enquanto que na marcação Sm-RNP do grupo tratado observa-se uma marcação mais frouxa e uniforme. Neste tipo celular foi observado também um aumento da marcação do antígeno, assim como o observado nas Hep-2 (Tabela 3).

Após o término dos ensaios com as células Hep-2 e Thp1, foram iniciados ensaios (n=2) preliminares com linfócitos B imortalizados de indivíduos sadios e de um paciente DGC com defeitos de “splicing” (IC) e um paciente DGC com mutação “non-sense” (MF), onde foi possível identificar alterações na marcação das proteínas do spliceossomo, mais evidentes com as proteínas Sm-RNPs. Infelizmente pela questão do tempo não foi possível dar continuidade aos ensaios testando células de outros pacientes assim como aumentar a quantidade de experimentos.

Nos dois indivíduos utilizados como controle, observou-se que na marcação negativa houve uma marcação dos anticorpos de superfície evidenciando estágios diferentes da cultura dos linfócitos B imortalizados com o vírus Epstein-Barr. A marcação SSA/Ro se mostrou naturalmente opaco e pouco marcado enquanto que a marcação Sm-RNP se mostrou opaca no citoplasma com um padrão de marcação do nucleoplasma de forma granular com aspecto grosseiro. No entanto foram observadas modificações sutis entre os dois controles utilizados, nos fazendo levar a crer que possivelmente existem modificações na marcação entre indivíduos sadios.


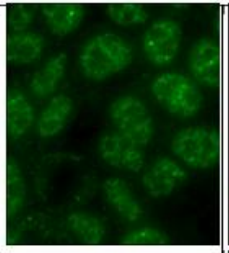
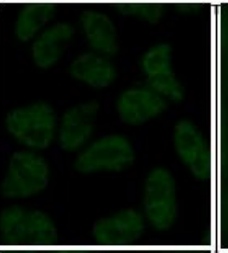
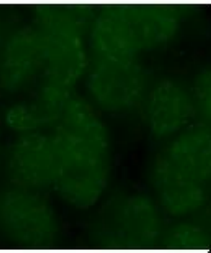

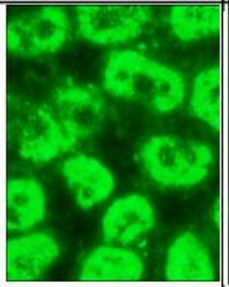
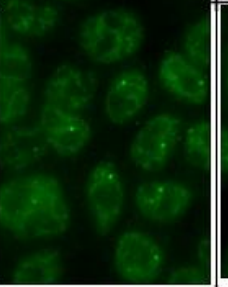
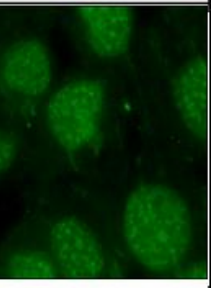
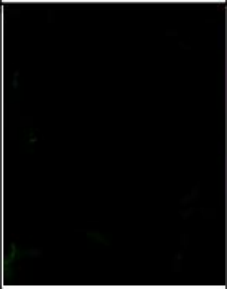
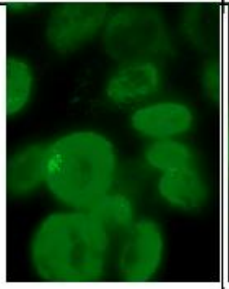
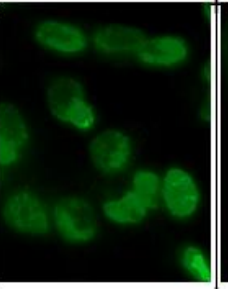
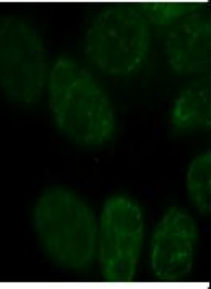
No paciente com defeito de “splicing” (IC) o padrão de marcação negativa encontrada foi parecida com a marcação para SSA/Ro, sendo este, para este paciente, igual ao padrão encontrado nos indivíduos controle. A marcação Sm-RNP para este paciente se mostra igual ao encontrado nos controle, no entanto um pouco mais evidente.

Para o paciente que apresenta mutação nonsense (MF) utilizado neste ensaio, os padrões de marcação negativos, SSA/Ro e Sm-RNP se mostraram iguais aos padrões encontrados no grupo controle.


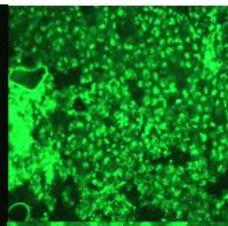
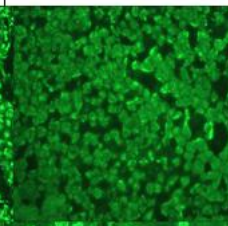
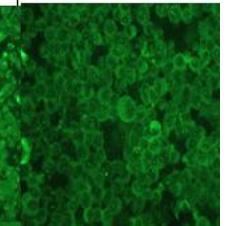

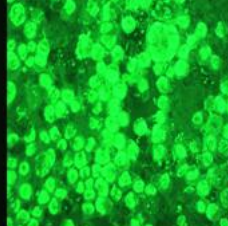
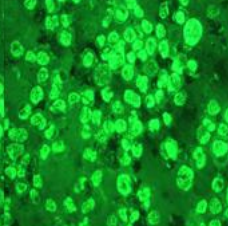
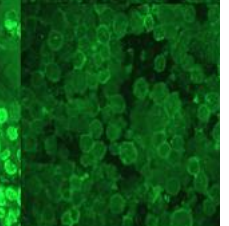
Pode-se constatar que o tratamento com IFN- $\gamma$  interfere apenas com a marcação Sm-RNP, causando um aumento da marcação, mostrando os grânulos com um aspecto maior e mais espessos um do outro.



**Tabela 2:** Fluorescência para detecção de proteínas do spliceossomo mostrando diferenças no padrão de marcação de com o tratamento das células Hep2 com IFN $\gamma$ .

	Neg [1:160]	RNP [1:160]	RNP [1:640]	Ro [1;160]
<b>Controle</b>				
<b>IFN-<math>\gamma</math> [10U/ml]</b>				
<b>IFN-<math>\gamma</math> [100U/ml]</b>				

**Tabela 3:** Fluorescência para detecção de proteínas do spliceossomo mostrando diferenças no padrão de marcação após o tratamento das células Thp1 com IFN $\gamma$ .

	Neg [1:160]	RNP [1:160]	RNP [1:640]	Ro [1;160]
<b>Controle</b>				
<b>IFN-<math>\gamma</math> [100U/ml]</b>				

## 7 DISCUSSÃO

A susceptibilidade a infecções bacterianas e fúngicas ainda é uma das principais características clínicas de pacientes com DGC, e, no entanto, a qualidade de vida desses pacientes tem melhorado de forma significativa com a introdução do IFN- $\gamma$ , diminuindo a frequência de infecções, número de hospitalizações, e melhora da qualidade de vida desses pacientes (The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group, 1991). Alguns relatos internacionais de literatura ainda apontam o aumento da resposta a antibióticos e fungicidas em pacientes com DGC submetidos à terapia com IFN- $\gamma$  (Ezekowitz, 1992; Murray, 1994).

O efeito do IFN- $\gamma$  em pacientes com DGC promove aumento da acidificação do pH no interior dos fagolisossomos, aumento da expressão de moléculas de superfície, de NO e da estabilidade de transcritos de RNA mensageiro, favorecendo o aumento da taxa de exportação de transcritos estáveis, possibilitando a correção de defeitos de “splicing” nos transcritos do gene *CYBB* em pacientes com DGC (Condino-Neto e Newburger, 2000). No entanto ainda existem controvérsias quanto ao melhor tratamento a ser adotado para DGC. É perceptível que houve progresso significativo com relação ao uso de antibióticos e antifúngicos aliados a terapuetica com IFN- $\gamma$ , porém, por outro lado, foram propostos protocolos para o trasnplante de medula e novos protocolos de terapia gênica continuam sendo investigados.

A maioria dos estudos realizados com o IFN- $\gamma$  visam alterações de superfície celular, eventos citoplasmáticos e a nível nuclear estudos de fatores de transcrição e grupos de genes associados, sem, contudo explicar o efeito do IFN- $\gamma$  sobre eventos pré-transcripcionais. Esta deficiência no conhecimento sobre os efeitos do IFN- $\gamma$  faz com que o presente trabalho seja uma dos poucos que descreve tais achados, contribuindo para o avanço na compreensão do papel do IFN- $\gamma$  sobre células de pacientes com DGC que apresentam defeitos em sítios de “splicing”, propiciando uma explicação racional para o efeito benéfico dessa citocina em pacientes portadores de DGC.

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de examinar os efeitos do IFN- $\gamma$  em pacientes com DGC através da geração de superóxido, da atividade do sistema NADPH oxidase e expressão de genes relacionados à DGC. O IFN- $\gamma$  aumenta a taxa de redução do NBT e a produção de superóxido a partir de granulócitos e macrófagos de pacientes com forma variante de DGC ligada ao X. No entanto, o mesmo não foi

observado em pacientes com a forma clássica de DGC nem em formas variantes autossômica da DGC (Ezekowitz *et al.*, 1987).

Neste trabalho analisamos em mais detalhe os efeitos *in vitro* do IFN- $\gamma$  sobre funções da NADPH oxidase incluindo a liberação de superóxido e expressão gênica da *CYBB* em pacientes com X-DGC por defeitos de splicing comparados a um paciente com DGC por mutação nonsense e indivíduos saudáveis. Por hipotetizar que mecanismos pré-transcricionais incluindo proteínas do spliciossoma possam estar envolvidos analisamos também a influência do IFN- $\gamma$  sobre as proteínas do splicing.

Com relação ao quadro clínico, o presente estudo teve a disponibilidade de acesso aos achados clínicos de 4 (GCG, RVSS, VG e MF) dos 5 pacientes. Não tivemos acesso aos achados clínicos do paciente IC (chileno). Todos os pacientes estudados são do sexo masculino, o que pode ser explicado pelo fato da herança ligada ao X ser a principal forma de apresentação da DGC, e apresentam mutação no componente gp91-*phox* que é o componente que apresenta a maior frequência de mutações (Agudelo-Flórez *et al.*, 2006). É importante salientar que a idade de início dos sintomas da DGC no nosso grupo de pacientes estudados e assim como em outros pacientes com DGC apresentados na literatura (Cale *et al.*, 2000; Forrest *et al.*, 1988; Liese *et al.*, 2000; Liese *et al.*, 1996; Winkelstein *et al.*, 2000) foi abaixo dos 2 anos de idade para os casos tidos como X-DGC. Os pacientes estudados apresentaram infecções recorrentes causadas por agentes comuns na DGC, e na maioria dos pacientes deste estudo as infecções chegam a atingir órgãos profundos. Os ensaios de fagocitose dos pacientes estudados demonstram que os pacientes possuem capacidade considerados normais para a fagocitose, no entanto os resultados dos ensaios funcionais de atividade dos espécimes reativos do oxigênio demonstram que os pacientes possuem um déficit quanto a esta produção, indicando que eles fagocitam porém não conseguem matar microorganismos fagocitados. Possivelmente existe um mecanismo compensador nestes pacientes estudados tendo em vista que eles apresentam valores de imunoglobulinas séricas (IgA, IgG e IgM) aumentadas, indicando uma ativação do sistema imune humoral, possivelmente na tentativa de conter infecções, mantendo este sistema em alerta. As infecções pulmonares são a forma mais comum de infecção invasiva na DGC (Forrest *et al.*, 1988; Gallin e Buescher, 1983; Muoy *et al.*, 1989; Winkelstein *et al.*, 2000) e estiveram presentes em todos os pacientes estudados, os envoltimentos pulmonares estão associados a aumento significativo de morbidade e mortalidade, uma vez que pneumonias de repetição podem evoluir para bronquiectasia e fibrose pulmonar.

O trato gastrointestinal é local freqüente de complicações infecciosas e/ou inflamatórias na DGC (Forrest *et al.*, 1988). Com o aumento da sobrevida observado nos dias atuais, as complicações gastrointestinais têm se tornado mais importantes. Mulholland e colaboradores (1983) encontraram acometimento gastrointestinal em 55% dos pacientes acompanhados num período de 10 anos, estando estes eventos associados a 18% do total de internações. A complicação mais freqüente na casuística apresentada por aquele autor foi o abscesso hepático. Antes de estabelecido o diagnóstico de DGC e instituído as medidas profiláticas, um dos pacientes estudados (VG) apresentou 8 episódios de abscesso hepático, todos tratados com drenagem cirúrgica e antibióticos parenterais. Formações de granulomas também são muito freqüentes acometendo os tratos gastrointestinal e urinário acarretando sintomas obstrutivos. No caso de um dos nossos pacientes (GCG) deste estudo apresentou em mediastino sem evidências de infecção, para os outros episódios de formação de granuloma (GCG) não foi realizado biópsia de lesão, porém considerou-se descartada etiologia infecciosa com base em aspectos clínicos e hemograma sem evidências de processo infeccioso. O tratamento dos quadros obstrutivos foi realizado com Prednisona 1 a 2 mg/kg/dia com resolução completa do quadro.

Considerando a suscetibilidade a infecções nos pacientes DGC, e a importância do IFN- $\gamma$  para o desenvolvimento, ativação e regulação do sistema NADPH oxidase, partimos para o estudo da atividade e expressão de *CYBB*.

Com relação a liberação de superóxido, em nossos estudos, as células polimorfonucleares, mononucleares e linfócitos B-EBV mostraram déficit na liberação de ânion superóxido após estímulo com PMA (30 nM) em pacientes com DGC por defeito de “splicing” no gene *CYBB*, com melhora de resposta após estímulo com IFN- $\gamma$ . É de conhecimento que o uso do IFN- $\gamma$  aumenta a expressão do gene *CYBB* e aumenta em maior grau a taxa de liberação de ânion superóxido em indivíduos normais e em menor grau em pacientes com defeito de “splicing” (Condino-Neto e Newburger, 2000; Condino-Neto e Newburger, 1998, Ishibashi *et al.*, 2001; Nuno *et al.*, 2004) e em nosso estudo podemos verificar que células polimorfonucleares e mononucleares do paciente VG apresentaram melhora na produção de ânion superóxido, tanto com, como sem a estimulação com PMA quando estas eram tratadas com IFN- $\gamma$ , e em linfócitos B imortalizados, pudemos também constatar melhora na produção de ânion superóxido após tratamento com IFN- $\gamma$  no grupo controle não estimulado e estimulado com PMA, assim como nos pacientes GCG estimulado com PMA e no paciente MF não estimulado

com PMA e no restante dos pacientes não podemos verificar esta melhora. Com estes resultados podemos constatar que há melhora de produção de anion superóxido em alguns pacientes, corroborando dados da literatura. Porém os níveis de melhora encontrados são ainda muito baixos, o que possivelmente sugere que a técnica utilizada pode não ser a técnica mais adequada para a realização da aferição da produção de anion superóxido avaliando a influência do IFN- $\gamma$ , como alternativa para a detecção do aumento da produção de anion superóxido. Sugerimos em outro futuro estudo a ser realizado por nosso grupo, ensaios que utilizam a redução da dihidrorodamida, uma técnica mais sensível, possibilitando assim, a detecção de modificações mais sutis na liberação de ânion superóxido antes e após o tratamento com IFN- $\gamma$ .

É de conhecimento na literatura que a estimulação de neutrófilos humanos com IFN- $\gamma$  causa um aumento da transcrição de mRNA da *gp91-phox* (Cassatella *et al.*, 1990), e o mesmo efeito é observado em monócitos e macrófagos, apesar de com uma cinética muito mais lenta que em neutrófilos. Em macrófagos, o tempo para a indução de mRNA da *gp91-phox* pode ser funcionalmente correlacionado com o aumento da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. A ciclohexamida bloqueia o “burst respiratório” induzido pelo IFN- $\gamma$  em macrófagos e em neutrófilos, mas não interfere com acumulação de mRNA de *gp91-phox* (Cassatella *et al.*, 1989). A indução do mRNA da *gp91-phox* pertence a categoria de resposta primária, e a ciclohexamida bloqueia o “burst respiratório” através do bloqueio da síntese da proteína *gp91-phox*. Estudos da região *up stream* do genoma da *gp91-phox* identificaram um elemento *cis* atuante com o promotor da *gp91-phox*, necessário, mas não suficiente para uma resposta ao IFN- $\gamma$ . A análise de seqüência, no entanto, não revelou qualquer elemento de resposta ao IFN- $\gamma$  conhecido, e estudos suplementares são necessários para explicar a indução do mRNA da *gp91-phox* num nível molecular (Eklund e Skalnik, 1995).

Através da quantificação foi possível notar uma expressão gênica diferenciada entre pacientes com DGC e controles sadios, e corroborando achados da literatura com nossos resultados com células polimorfonucleares foi possível notar que os níveis de expressão encontrados são maiores que os encontrados para células mononucleares, células Thp1 e linfócitos B-EBV; também foi possível verificar que em células polimorfonucleares, as células dos indivíduos saudáveis e do paciente VG apresentam melhora/aumento da expressão relativa quando tratadas com IFN- $\gamma$ . Em células mononucleares, o paciente VG e o paciente MF apresentam expressão relativa aumentada quando tratadas com IFN- $\gamma$ . Em células Thp1 e em linfócitos B-EBV, pode-

se notar um aumento da expressão do *CYBB* em todas as células utilizadas neste ensaio quando tratadas com IFN- $\gamma$ . É perceptível que em células polimorfonucleares, células mononucleares e em linfócitos B-EBV os níveis de expressão apresentam uma tendência em ser diferente entre pacientes com mutações diferentes, entre pacientes que apresentam mesma mutação e até mesmo entre populações celulares distintas do mesmo paciente, sugerindo que algum outro sistema possa estar sendo envolvido na expressão gênica e/ou regulação da expressão do *CYBB* e possa se mostrar induzido pelo IFN- $\gamma$ . Foi perceptível através deste ensaio que o IFN- $\gamma$  aumenta a expressão gênica do *CYBB* em pacientes DGC com e sem defeitos de splicing, o que demonstra a importância do uso desta citocina como alternativa de tratamentos para a DGC. No entanto ainda há a necessidade de avanço acerca dos mecanismos que causam esse aumento de expressão além da tentativa de elucidação de como o mecanismo atua sobre diferentes pacientes.

Analisando os resultados encontrados em nosso estudo, para os ensaios de expressão gênica por PCR que amplificaram os fragmentos compreendidos entre os exons da região onde estavam presentes os defeitos de splicing dos pacientes em estudo vimos que o IFN- $\gamma$  aumenta a taxa de expressão do gene *CYBB*, corroborando dados da literatura (Condino-Neto e Newburger, 2000; Condino-Neto e Newburger, 1998, Ishibashi *et al.*, 2001; Nuno *et al.*, 2004). No entanto, não foi possível identificar modificações no padrão de banda sugestivo de uma correção do defeito, possivelmente somente através de uma técnica diferenciada pela qual seja possível extrair o RNA nuclear e o RNA citoplasmático, separadamente, seja possível identificar tais modificações. Nos pacientes que apresentam mutações em sítios de “splicing” observou-se que estes apresentaram um tipo de transcrito tanto no grupo que recebeu IFN- $\gamma$  quanto no grupo que não recebeu. Este transcrito é menor devido ao defeito genético que causa a eliminação de um exon. Observou-se que mesmo com o exon eliminado ocorre um aumento da expressão do transcrito após o tratamento com IFN- $\gamma$ , sugerindo que o IFN- $\gamma$  atue em alguma etapa do processamento do RNAm. Para investigar esta hipótese passamos a concentrar esforços em um grupo particular de proteínas responsáveis pelo mecanismo denominado “splicing” que compõem um complexo de proteínas denominado spliceossomo.

O pré-mRNA sofre “splicing” em um mecanismo de duas etapas (Ruskin *et al.*, 1984; Padgett *et al.*, 1984; Padgett *et al.*, 1986; Green 1986). Na primeira etapa, o pré-mRNA é clivado no sítio 5' do splicing, gerando simultaneamente dois splicing intermediários, uma espécie de RNA linear do primeiro exon, e uma espécie de RNA do

segundo intron e exon numa configuração “lariat”. O “lariat” é o resultado da ligação do 2’-5’ fosfodiéster (chamado de “RNA branch”) entre a guanosina no sítio de splicing na região 5’ e o T-hidroxil de uma adenosina próximo do término 3’ do intron. Na segunda etapa, o sítio de splicing 3’ é clivado, e concomitantemente, os dois exons são ligados gerando o mRNA que sofreu o “splicing” e o intron é excluído na configuração “lariat” (Guthrie, 1989).

A formação do spliceossomo, primeiro, deve trazer o sítio de “splicing” 5’ e o sítio de ligação para a proximidade para facilitar a formação do “RNA branch”. Acredita-se que durante a formação do spliceossomo a catálise é formada por componentes individuais. Parece provável que os sítios de “splicing” apropriados são alinhados propriamente durante o processo de formação do spliceossomo. A formação do spliceossomo é composta por uma série de eventos dinâmicos onde pequenas riboproteínas nucleares (snRNP – Small Nuclear Ribonucleoproteins) e fatores de splicing não snRNP interagem com o pré-mRNA entre eles para sofrerem alterações conformacionais levando o processo adiante. Apesar das divisões serem arbitrárias, a formação do spliceossomo pode ser dividido em estágios representando eventos separados do snRNP. Primeiro, U1 snRNP se liga ao sítio de “splicing” 5’ (Mount *et al.*, 1983; Kramer *et al.*, 1984; Chabot e Steitz, 1987; Bindereif e Green, 1987; Ruby e Abelson, 1988; Seraphin *et al.*, 1988; Seraphin e Rosbash, 1989). Em seqüência, U2 snRNP se liga a uma região compreendendo o sítio da formação do “RNA branch” (sítio de ligação). Terceiro, seguindo essas duas interações pré-RNA/snRNP, uma partícula já existente (U4/U6/U5) é unida ao complexo (Konarska e Sharp, 1987; Cheng e Abelson, 1987). Quarto, antes da primeira etapa do “splicing”, uma mudança conformacional ocorre e desestabiliza a associação do U4 snRNP com o complexo (Pikielny *et al.*, 1986; Cheng e Abelson, 1987; Konarska e Sharp, 1987; Blencowe *et al.*, 1989). A segunda etapa do splicing é composta pela clivagem do sítio de “splicing” 3’ e ligação concomitante dos dois exons. Assim como na primeira etapa do “splicing”, a hidrólise do ATP é requerida para o procedimento da segunda etapa proceder (Vijayraghavan, 1990; Sawa *et al.*, 1988). Tendo isso em vista e sabendo que o IFN- $\gamma$  possui a capacidade de alterar o processamento da mensagem e estabilidade dos transcritos (Condino-Neto e Newburger, 2000; Condino-Neto e Newburger, 1998, Ishibashi *et al.*, 2001; Nuno *et al.*, 2004) ficamos interessados em investigar se o IFN- $\gamma$  poderia afetar também as proteínas responsáveis pelo mecanismo de splicing.

Passamos a estudar o mecanismo pré-transcricionais do “splicing”, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta para a marcação de proteínas spliceossomais intranucleares, para testar a hipótese de que o IFN- $\gamma$  altera esse sistema. Tendo isso em vista, foram realizados estudos de marcação de proteínas do spliceossomo em células de linhagem Hep2, Thp1 e linfócitos B imortalizados com EBV com ou sem IFN- $\gamma$ , para saber se havia alguma influência do IFN- $\gamma$  sobre a expressão dessas proteínas.

Nossos resultados demonstraram que o IFN- $\gamma$  influencia a expressão e a distribuição das proteínas sm-RNPs e SSA/Ro do spliceossomo, sendo observado que as proteínas que estavam presentes apenas no núcleo das células não tratadas, com o tratamento com IFN- $\gamma$  migraram em direção ao citoplasma nas células Hep2 e Thp1 além de causar outras modificações na distribuição dos antígenos nas duas linhagens celulares, Hep2 e Thp1 e linfócitos B-EBV. Os resultados encontrados para estes ensaios explicam em parte os resultados encontradas em outros trabalhos que mencionam modificações no processamento da mensagem e estabilidade dos transcritos após o uso de IFN- $\gamma$  (Condino-Neto e Newburger, 2000; Condino-Neto e Newburger, 1998, Ishibashi *et al.*, 2001; Nuno *et al.*, 2004).

Apesar dos esforços do nosso grupo de pesquisa, no Brasil o IFN- $\gamma$  humano recombinante não é autorizado a entrar no mercado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, comprometendo os benefícios que os pacientes poderiam ter com o uso regular desta citocina. Por outro lado, observa-se que nem todos os pacientes com DGC beneficiam-se de forma significativa do uso do IFN- $\gamma$ . Isto é objeto de estudo em nosso laboratório por meio da investigação dos efeitos do IFN $\gamma$  na atividade e expressão dos genes da NADPH oxidase em pacientes que apresentam DGC ocasionada por erros de splicing no gene *CYBB*.

Nossos resultados, até o presente momento, dão indícios que o IFN- $\gamma$  atua a nível transcricional causando modificações em mecanismos moleculares responsáveis pela expressão do gene *CYBB*. Demonstramos que o IFN- $\gamma$  causa uma aumento na expressão de transcritos totais do gene que codifica a componente gp91-*phox*, além de causar modificações na expressão e distribuição de proteínas do spliceossoma, porém encontramos dificuldades em comprovar a melhora na produção do anion superóxido.

Nosso trabalho é o primeiro na literatura que aborda o contexto das proteínas do spliceossoma, encontrando um elo para que comprove a melhora do mecanismo de splicing, assim como a correção parcial do defeito molecular responsável pelo déficit no “burst” oxidativo em pacientes com DGC ocasionada por defeitos de splicing. A



continuação do nosso estudo pretende fornecer subsídios para o uso sistemático do IFN- $\gamma$  num sub-grupo de pacientes que apresentam DGC por defeitos de “splicing” cujas células são responsivas em ensaios *in vitro*.

## 8. CONCLUSÃO

O uso do IFN- $\gamma$  aumenta a liberação de anion superóxido tanto de indivíduos sadios quanto nos pacientes estudados, sendo que este aumento da liberação de anion superóxido é maior em células polimorfonucleares.

O uso do IFN- $\gamma$  aumenta a expressão de transcritos do gene da *gp91-phox* tanto de indivíduos sadios quanto dos pacientes estudados.

O uso do IFN- $\gamma$  age a nível pré-trascricional aumentando a quantidade de proteínas que participam no processo do “splicing”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J.* 1994 Mar 15;298 Pt 3:585-591.

Agudelo-Flórez P, Prando-Andrade CC, López JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FJ, de Souza Paiva MA, Roxo P Jr, Grumach A, Jacob CA, Carneiro-Sampaio MM, Newburger PE, Condino-Neto A. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 Feb;46(2):243-52.

Agudelo-Flórez P, Navarro S, Luttges P, López JA, Norambuena X, Navarrete S CL, Quezada A, Spencer M, Condino-Neto A, Cornejo de M. [Report of a new mutation in CYBB gene in two patients with X linked chronic granulomatous disease] *Rev Med Chil.* 2006 Aug;134(8):965-72.

Amrolia P, Gaspar HB, Hassan A, Webb D, Jones A, Sturt N, Mieli-Vergani G, Pagliuca A, Mufti G, Hadzic N, Davies G, Veys P. Nonmyeloablative stem cell transplantation for congenital immunodeficiencies. *Blood.* 2001;96:1239-1246.

Aoshima M, Nuno H, Shimazu M, Shimazu S, Tatsuzawa O, Kenney RT, Kanegasaki S. Two-exon skipping due to a point mutation in p67-phox-deficient chronic granulomatous disease. *Blood.* 1996;88:1841-1845.

Ariga T, Sakiyama Y, Furuta H, Matsumoto S. Molecular genetic studies of two families with X-linked chronic granulomatous disease: Mutation analysis and definitive determination of carrier status in patients' sisters. *Eur. J. Haematol.* 1994a;52: 99-102.

Ariga T, Sakiyama Y, Matsumoto S. Two novel point mutations in the cytochrome b 558 heavy chain gene; detected in two Japanese patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Hum. Genet.* 1994b;94:441.

Ariga T, Sakiyama Y, Matsumoto SA. 15-base pair (bp) palindromic insertion associated with a 3-bp deletion in exon 10 of the gp91-phox gene, detected in two patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Hum.Genet.* 1995;96:6-8.

Ariga T, Furuta H, Cho K, Sakiyama Y. Genetic analysis of 13 families with X-linked chronic granulomatous disease reveals a low proportion of sporadic patients and a high proportion of sporadic carriers. *Pediatr. Res.* 1998;44:85-92.

Assari T. Chronic granulomatous disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol,* 2006;5:1-8.

Azuma H, Oomi H, Sasaki K, Kawabata I, Sakaino T, Koyano S, Suzutani T, Nuno H, Okuno A. A new mutation in exon 12 of the gp91-phox gene leading to cytochrome b-positive X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 1995;85:3274-3277

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxide; a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 1973;52:741-744.

De acordo com:

International committee of Medical Journal Editors Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmic.org>. [2004 May 06]

- Babior BM. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. Part I. N. Engl. J. Med. 1978;298:659-668.
- Babior BM, Peters WA. The O<sub>2</sub>--producing enzyme of human neutrophils. Further properties. J Biol Chem. 1981 Mar 10;256(5):2321-3.
- Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. Arch Biochem Biophys. 2002 Jan 15;397(2):342-344.
- Bader T, Wietzerbin J. Nuclear accumulation of interferon- $\gamma$  Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994;91:11831-11835
- Badwey JA, Karnovsky ML. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Annu Rev Biochem. 1980;49:695-726.
- 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.
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8; a novel cytokine that activates neutrophils. J. Clin. Invest. 1989;84:1045-1049.
- Baggiolini M, Boulay F, Badwey JA, Curnutte JT. Activation of neutrophilleukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. FASEB J. 1993;7:004-1010
- Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. Immunol. Rev. 1991;124:5-24.
- Becker EL, Sigman M, Oliver JM. Superoxide production induced in rabbit polymorphonuclear leukocytes by synthetic chemotactic peptides and A23187. Am.J.Pathol. 1979;95:81-97.
- Bei L, Lu Y, Eklund EA. HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation. J Biol Chem. 2005 Apr 1;280(13):12359-70.
- Bemiller LS, Roberts DH, Starko KM, Curnutte JT. Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. Blood Cells Mol. Dis. 1995;21:239-247.
- Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. Minn. Med. 1957;40:309-312.
- Bhattacharyya GK, Johnson RA. Nonparametric inference. In: Bhattacharyya GK, Johnson RA, editors. Statistical concepts and methods. Singapore: John Wiley; 1977. p. 505-547.
- Bindereif A, Green MR. An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly. EMBO J. 1987 Aug;6(8):2415-24.
- Blencowe BJ, Sproat BS, Ryder U, Barabino S, Lamond AI. Antisense probing of the human U4/U6 snRNP with biotinylated 2'-OME RNA oligonucleotides. Cell 1989;9:531-539.
- Bluyssen HAR, Muzaffar R, Vlietstra RJ, van der Made AC, Leung S, Stark GR, Kerr IM, Trapman J, Levy DE. Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995;92:5645-5649

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-95.

Bolscher BGJM, De Boer M, De Klein A, Weening RS, Roos D. Point mutations in the  $\beta$ -subunit of cytochrome  $b_{558}$  leading to X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 1991;77:2482-2487.

Bottone EJ, Douglas SD, Rausen AR, Keusch GT. Association of *Pseudomonas cepacia* with chronic granulomatous disease. *J.Clin.Microbiol.* 1975;1:425-428.

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.

Bu-Ghanim HN, Segal AW, Keep NH, Casimir CM. Molecular analysis in three cases of X91<sup>-</sup> variant chronic granulomatous disease. *Blood* 1995;86:3575-3582.

Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 2001;99(1):7-17.

Burnham DN, Tyagi SR, Uhlinger DJ, Lambeth JD. Diacylglycerol generation and phosphoinositide turnover in human neutrophils effects of particulate versus soluble stimuli. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989;269:345-363.

Cale CM, Jones AM, Goldblatt D. Follow up of patients with chronic granulomatous disease diagnosed since 1990. *Clin Exp Immunol.* 2000 May;120(2):351-355.

Casanova JL, Blabche S, Emile JF, Jouanguy E, Lamhamedi S, Altare F, Stephan JL, Bernaudin F, Bordigoni P, Dommergues JP, Pocard MA, Le Deist F, Gaillard JL, Griscelli C, Fisher A. A Idiopathic disseminates bacillus Calmette-Guerin infection: a French national retrospective study. *Pediatrics* 1996;98:774-8.

Casimir CM, Bu-Ghanim HN, Rodaway ARF, Bentley DL, Rowe P, Segal AW. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:2753-2757.

Cassatella MA, Hartman L, Perussia B, Trinchieri G. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome  $b_{245}$  heavy chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase in human leukemic myeloid cells. *J. Clin. Invest.* 1989;83:1570-1579.

Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F. Molecular basis of interferon- and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J. Biol. Chem.* 1990;265:20241-20246

Chabot B, Steitz JA. Multiple interactions between the splicing substrate and small nuclear ribonucleoproteins in spliceosomes. *Mol Cell Biol.* 1987 Jan;7(1):281-93.

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

Chanock SJ, El Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 1994;269:24519-24522.

Cheng SC, Abelson J. Spliceosome assembly in yeast. *Genes* ; 1987 Dec; 1:1014-1027.

Chin KV, Cade C, Brostrom CO, Galuska EM, Brostrom MA. Calcium-dependent regulation of protein synthesis at translational initiation in eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 1987 Dec 5;262(34):16509-14.

Clark RA, Malech HL, Gallin JI, Nuno H, Volpp BD, Pearson DW, Nauseef WM, Curnutte JT. Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med* 1989;321(10):647-52.

Collman RJ, Dickerman JD. Corticosteroids in the management of cystitis secondary to chronic granulomatous disease. *Pediatrics.* 1990 Feb;85(2):219-221.

Condino-Neto A, Muscará MN, Grumach AS, Carneiro-Sampaio MMS, De Nucci G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1993;35:485-490.

Condino-neto A, Muscará MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandão AC, Grumach AS, De Nucci G. Effect of therapy with recombinant human interferon-gamma on the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16(5):357-364.

Condino-Neto A, Rae J, Padden C, Whitney C, Curnutte JT, Newburger PE. An intronic mutation in CYBB gene leading to RNA instability and variant X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 1997;90:599a.

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;360:158-164.

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(11):3548-3554.

Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. A diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* 1999;93:190-197

Cross AR, Yarchover JL, Curnutte JT. The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox *J Biol Chem.* 1994 Aug 26;269(34):21448-54.

Cross AR, Rae J, Curnutte JT. Cytochrome b<sub>245</sub> of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91<sup>phox</sup>. *J. Biol. Chem.* 1995;270:17075-17077.

Cross AR, Curnutte JT. The cytosolic factors p47-phox and p67-phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 1995;270:6543-6548.

Cross AR, Noack D, Rae J, Curnutte JT, Heyworth PG. Hematologically important mutations: The autosomal Recessive forms of Chronic Granulomatous Disease (First Update). *Blood Cells Mol. Dis.* 2000;26:561-565.

Cross AR, Curnutte JT, Rae J, Heyworth PG. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol. Dis.* 1996;22:90-95.

Cross AR. p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem J.* 2000 Jul 1;349(Pt 1):113-7.

Curnutte JT, Babior BM, Karnovsky ML. Fluoride-mediated activation of the respiratory burst in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1979;63:637-647.

Curnutte JT. The classification of chronic granulomatous disease. *Hematol. /Oncol. Clin. N. Am.* 1988;2:241-252.

Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: The solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993;67:S2-S15.

Curnutte JT, Orkin SH, Dinauer MC. Genetic disorders of phagocyte function. In: Stamatoyannopoulos G, Neinhuis AW, Majerus PW, Varmus H, editors. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 2nd Ed ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994. p. 493-540.

Danziger LH, Kanyok TP, Novak RM. Treatment of cryptosporidial diarrhea in an AIDS patient with paromomycin. *Ann Pharmacother.* 1993 Dec;27(12):1460-1462.

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421

de Boer M, Bolscher BG, Dinauer MC, Orkin SH, Smith CI, Ahlin A, Weening RS, Roos D. Splice site mutations are a common cause of X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 1992;80:1553-1558.

De Boer M, Hilarius-Stokman PM, Hossle JP, Verhoeven AJ, Gra N, Kenney RT, Seger R, Roos D. Autosomal recessive chronic granulomatous disease with absence of the 67-kD cytosolic NADPH oxidase component: Identification of mutation and detection of carriers. *Blood* 1994;83:531-536.

de Boer M, Singh V, Dekker J, Di Rocco M, Goldblatt D, Roos D. Prenatal diagnosis in two families with autosomal, p47(phox)-deficient chronic granulomatous disease due to a novel point mutation in NCF1. *Prenat Diagn.* 2002 Mar;22(3):235-40.

De Saint-Basile G, Bohler MC, Fischer A, Cartron J, Dufier JL, Griscelli C, Orkin SH. Xp21 DNA microdeletion in a patient with chronic granulomatous disease; retinitis pigmentosa; and McLeod phenotype. *Hum. Genet.* 1988;80:85-89.

- DeLeo FR, Allen LA, Apicella M, Nauseef WM. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol*. 1999 Dec 15;163(12):6732-6740.
- DeLeo TA, Hashizume H, Rutkowski MD, Weinstein TN. Cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 attenuates mechanical allodynia following nerve root injury in rats. *J Orthop Res*. 2000 Nov;18(6):977-82.
- Derynck R, Leung DW, Gray DV, Goeddel DV. Human interferon- $\gamma$  is encoded by a single class of mRNA. *Nucleic Acids Res*. 1982;10:3605-3615
- Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*. 1989 Oct 5;264(28):16378-82.
- Diekmann AB, Goldberg E. Characterization of a human antigen with sera from infertile patients. *Biol Reprod*. 1994 May;50(5):1087-1093
- Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature*. 1987 Jun 25-Jul 1;327(6124):717-20.
- Dinauer MC, Curnutte JT, Rosen H, Orkin SH. A missense mutation in the neutrophil cytochrome b heavy chain leading to X-linked chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest*. 1989;84:2012-2016.
- Dinauer MC. The phagocyte system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. In: Nathan DG, Orkin ST editors. *Hematology of Infancy and Childhood*, Philadelphia: Saunders; 1998. p. 889-920.
- 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;86:1729-1737.
- Dinauer MC, Lekstrom-Himes JA, Dale DC. Inherited neutrophil disorders: molecular basis and new therapies. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)* 2000;303-318.
- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 1996;84:443-450.
- Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE. Three-dimensional structure of recombinant human interferon- $\gamma$ . *Science* 1991;252:268-702.
- Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med*. 1998 Aug-Oct;19(4-5):221-357.
- Eklund EA, Skalnik DG. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J Biol Chem*. 1995 Apr 7;270(14):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(6):2418-2429.



Eklund EA, Jalava A, Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J Biol Chem* 1998;273(22):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(11):6095-6105.

Eklund EA, Jalava A, Kakar R. Tyrosine phosphorylation of HoxA10 decreases DNA binding and transcriptional repression during interferon gamma -induced differentiation of myeloid leukemia cell lines. *J Biol Chem* 2000;275(26):20117-20126.

English D, Andersen BR. Single-step of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque". *J Immunol Methods* 1995;5:249-252.

Ezekowitz RAB, Orkin SH, Newburger PE. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 1987;80:1009-1016.

Ezekowitz RAB, Dinanuer MC, Jaffe HS, Orkin SH, Newburger PE. Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *N. Engl. J. Med.* 1988;319:146-151.

Ezekowitz RA. Chronic granulomatous disease: an update and a paradigm for the use of interferon-gamma as adjunct immunotherapy in infectious diseases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;181:283-92.

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 1993;11:571-611

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:571-611.

Faust LR, el Benna J, Babior BM, Chanock SJ. The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest.* 1995 Sep;96(3):1499-505.

Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Johnston RB Jr. Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. *Hematol./Oncol.Clin.N.Am.* 1988;2:253-266.

Fountoulakis M, Zulauf M, Lustig A, Garotta G. 1992. Stoichiometry of interaction

Francke U, Hsieh CL, Foellmer BE, Lomax KJ, Malech HL, Leto TL. Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23 (NCF1). *Am J Hum Genet.* 1990 Sep;47(3):483-92.

Frey D, Mächler M, Seger RA, Schmid W, Orkin SH. Gene deletion in a patient with chronic granulomatous disease and McCleod syndrome: Fine mapping of the Xk gene locus. *Blood* 1988;71:252-255.

Gallin JI, Buescher ES Abnormal regulation of inflammatory skin responses in male patients with chronic granulomatous disease. *Inflammation*. 1983 Sep;7(3):227-32.

Gao PQ, Sims SH, Chang DC, Deisseroth AB. Interferon- priming effects in the activation and deactivation of ISGF3 in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:12380–12387

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25(4):386-401.

Gmünder FK, Seger RA. Chronic granulomatous disease: mode of action of sulfamethoxazole/trimethoprim. *Pediatr Res.* 1981 Dec;15(12):1533-7.

Gorlach A, Lee P, Roesler J, Hopkins PJ, Christensen B, Green ED, Chanock SJ, Curnutte JT. A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox deficient chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 1997;100:1907-1918.

Green MR. Pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Genet.* 1986;20:671-708.

Greenlund AC, Wenner CA, Schreiber RD. Analysis of IFN- $\gamma$  receptor binding to IFN- $\gamma$ . *J. Interferon Res. (Abstr.)* 1992;12:103

Greenlund AC, Schreiber RD, Goeddel DV, Pennica D. Interferon- $\gamma$  induces receptor dimerization in solution and on cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:18103–18110

Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* 1994 Apr 1;13(7):1591-600.

Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J, Schreiber RD. Stat recruitment by tyrosinephosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* 1995;2:677–687.

Grumach AS, Duarte AJ, Bellinati-Pires R, Pastorino AC, Jacob CM, Diogo CL, Condino-Neto A, Kirschfink M, Carneiro-Sampaio MM. Brazilian report on primary immunodeficiencies in children: 166 cases studied over a follow-up time of 15 years. *J. Clin. Immunol.* 1997;17:340-345.

Gupta JW, Kubin M, Hartman L, Cassatella M, Trinchieri G. Induction of expression of genes encoding components of the respiratory burst oxidase during differentiation of human myeloid cell lines induced by tumor necrosis factor and  $\gamma$ -interferon. *Cancer Res.* 1992;52:2530–2537

Guthrie C. Catalytic RNA and RNA splicing. *Am. Zool.* 1989;29:557-567.

Halliwell B. Free radicals; antioxidants; and human disease: curiosity; cause; or consequence? *Lancet* 1994;344:721-724.

Han F, Xue J, Lin B. Mannitol influence on the separation of DNA fragments by capillary electrophoresis in entangled polymer solutions. *Talanta*. 1998 Aug;46(4):735-42.

Hardy KJ, Sawada T. Human-interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989;170:1021-1026

Hasui M, Hirabayashi Y, Hattori K, Kobayashi Y. Increased phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes of chronic granulomatous disease as determined with flow cytometric assay. *J. Lab. Clin. Med.* 1991;117:291-298.

Heyworth PG, Shrimpton CF, Segal AW. Localization of the 47 kDa phosphoprotein involved in the respiratory-burst NADPH oxidase of phagocytic cells. *Biochem J.* 1989 May 15;260(1):243-8.

Heyworth PG, Curnutte JT, Nauseef WM, Volpp BD, Pearson DW, Rosen H, Clark RA. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J Clin Invest.* 1991 Jan;87(1):352-6.

Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell.* 1993 Nov;4(11):1217-23.

Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J, Noack D, Roos D, van Koppen E, Cross AR. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis* 2001;27(1):16-26.

Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, Carter CS, Childs R, Gallin JI, Holland SM, Linton GF, Miller JA, Leitman SF, Read EJ, Malech HL. Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N.Engl.J.Med.* 2001;344:881-888.

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.* 93: 437-442; 1994.

Humbert JR, Fishman CB, Weston WL, DeArme PA, Thoren CH. Frequency of the carrier state for X-linked chronic granulomatous disease among females with lupus erythematosus. *Clin Genet.* 1976 Jul;10(1):16-20.

Igarashi K, Garotta G, Ozmen L, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Larner AC, Finbloom DS. Interferon- $\gamma$  induces tyrosine phosphorylation of interferon- $\gamma$  receptor and regulated

association of protein kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J. Biol. Chem.* 1994;269:14333–14336

Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1995;13:369–398

Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996;84:331–334

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;98:436-441

Islam S, Zaidi AK, Wilson J. Peritoneal infection with multiple species of *Candida*: a case report. *Surg Infect (Larchmt)*. 2002 Spring;3(1):35-7.

Iwata M, Nunoi H, Yamazaki H, Nakano T, Niwa H, Tsuruta S, Ohga S, Ohmi S, Kanegasaki S, Matsuda I. Homologous dinucleotide (GT or TG) deletion in Japanese patients with chronic granulomatous disease with p47-phox deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199:1372-1377.

Jacobs RF, Wilson CB. Activity of antibiotics in chronic granulomatous disease leukocytes. *Pediatr Res.* 1983 Nov;17(11):916-9.

Jacobsen BM, Skalnik DG. YY1 binds five cis-elements and trans-activates the myeloid cell-restricted gp91(phox) promoter. *J Biol Chem* 1999;274(42):29984-29993.

John J, McKendry R, Pellegrini S, Flavell D, Kerr IM, Stark GR. Isolation and characterization of a new mutant human cell line unresponsive to alpha and beta interferons. *Mol Cell Biol.* 1991 Aug;11(8):4189-95.

Johnston N, Bridges JB, Nevin NC. Quantitative nitroblue tetrazolium test in mongolism. *Ir J Med Sci.* 1975 Nov;144(11):422-5.

Johnston RB, Harbeck RJ, Johnston RB Jr. Recurrent severe infections in a girl with apparently variable expression of mosaicism for chronic granulomatous disease. *J. Pediatr.* 1985;106:50-55.

Johnston RB Jr. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol.* 2001;8:17-22.

Jouanguy, E., 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;100:2658–2664.

Karlsson A, Dahlgren C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:49-60.

Kautz B, Kakar R, David E, Eklund EA. 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 genes. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):37868-78.

Kenney RT, Malech HL, Epstein ND, Roberts RL, Leto TL. Characterization of the p67<sup>phox</sup> gene: Genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood* 1993;82:3739-3744.

Kerr IM, Stark GR. The antiviral effects of the interferons and their inhibition. *J. Interferon Res*. 1992;12:237-240

Kerr JR, Curran MD. Applications of polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism to microbiology. *Clin Mol Pathol*. 1996 Dec;49(6):M315-M320.

Kim TK, Maniatis T. Regulation of interferon- $\gamma$ -activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1996;273:1717-1719

Klebanoff SJ, Nathan CF. Nitrite production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes supplemented with azide and catalase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Nov 30;197(1):192-6.

Kleinberg ME, Mital D, Rotrosen D, Malech HL. Characterization of a phagocyte cytochrome b558 91-kilodalton subunit functional domain: identification of peptide sequence and amino acids essential for activity. *Biochemistry*. 1992 Mar 17;31(10):2686-90.

Knaus UG, Morris S, Dong HJ, Chernoff JE, Bokoch GM. Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. *Science* 1995;269:221-223.

Konarska MM, Sharp PA. Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes. *Cell* 1987;49:763-74.

Koo C, Lefkowitz RJ, Snyderman R. The oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocyte membranes exists in two affinity states. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1982;106:442-449.

Koo C, Lefkowitz RJ, Snyderman R. Guanine nucleotides modulate the binding affinity of the oligopeptide chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest*. 1983;72:748-753.

Koshkin V, Pick E. Superoxide production by cytochrome b559. Mechanism of cytosol-independent activation. FEBS Lett. 1994 Feb 7;338(3):285-9.

Kramer A, Keller W, Appel B, Luhrmann R. The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. Cell 1984;38:299-307.

Kumatori A, Yang D, Suzuki S, Nakamura M. Cooperation of STAT-1 and IRF-1 in interferon-gamma-induced transcription of the gp91(phox) gene. J Biol Chem. 2002 Mar 15;277(11):9103-11.

Landing BH, Shirkey HS. A syndrome of recurrent infection and infiltration of the viscera by pigmented lipid histiocytes. Pediatrics 1957;20:431-442.

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(4956):727-30.

Leto TL, Adams AG, De Mendez I. - Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: Binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994;91:10650-10654.

Leusen JHW, De Boer M, Bolscher BGJM, Hilarius PM, Weening RS, Ochs HD, Roos D, Verhoeven AJ. A point mutation in gp91-phox of cytochrome b<sub>558</sub> of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. J. Clin. Invest. 1994;93:2120-2126.

Leusen JHW, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: Intrigues in the phox family. J. Lab. Clin. Med. 1996;128:461-476.

Lew PD, Southwick FS, Stossel TP, Whitin JC, Simons ER, Cohen HJ. A variant of chronic granulomatous disease: Deficient oxidative metabolism due to a low-affinity NADPH oxidase. N. Engl. J. Med. 1981;305:1329-1333.

Liese JG, Jendrossek V, Jansson A, Petropoulou T, Kloos S, Gahr M, Belohradsky BH. Chronic granulomatous disease in adults. Lancet 1996;347:220-223.

Liese J, Kloos S, Jendrossek V, Petropoulou T, Wintergerst U, Notheis G, Gahr M, Belohradsky BH. Long-term follow-up and outcome of 39 patients with chronic granulomatous disease. J Pediatr 2000;137(5):687-693.

Lindskov R, Munkvad JM, Valerius NH. Discoid lupus erythematosus and carrier status of X-linked chronic granulomatous disease. Dermatologica. 1983;167(5):231-3.

Luengo-Blanco M, Prando C, Bustamante J, Aragão-Filho WC, Pereira PV, Rehder J, Padden C, Casanova JL, Newburger PE, Condino-Neto A. Essential role of nuclear factor-kappaB for NADPH oxidase activity in normal and anhidrotic ectodermal dysplasia leukocytes. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):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;271(30):18203-18210.

Malech HL, Bauer TR Jr, Hickstein DD. Prospects for gene therapy of neutrophil defects. *Semin Hematol*. 1997 Oct;34(4):355-61.

Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ, Li F, Miller JA, DeCarlo E, Holland SM, Leitman SF, Carter CS, Butz RE, Read EJ, Fleisher TA, Schneiderman RD, Van Epps DE, Spratt SK, Maack CA, Rokovich JA, Cohen LK, Gallin JI. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 28;94(22):12133-8.

Margolis DM, Melnick DA, Alling DW, Gallin JI. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomaotus disease. *J. Infect. Dis*. 1990;162:723-726.

Martín Mateos MA, Alvaro M, Giner MT, Plaza AM, Sierra JI, Muñoz-López F. Chronic granulomatous disease: six new cases. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1998 Sep-Oct;26(5):241-9.

Mccord J, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem*. 1969;244:6044-6055.

McPhail LC, Snyderman R. Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. *J. Clin. Invest*. 1983;72:192-200.

McPhail LC, Clayton CC, Snyderman R. The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. *J. Biol. Chem*. 1984;259:5768-5775.

McPhail LC, Shirley PS, Clayton CC, Snyderman R. Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. *J Clin Invest* 1985;75(5):1735-9.

Meraz MA, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiological specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 1996;84:431-442

Messina G, Quartarone E, Fujo M, Irrera G, Console G, Martino M, Mandaglio R, Morabito F, Iacopino P. Basiliximab for the treatment of graft rejection in haploidentical peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica*. 2002 Dec;87(12):ECR44.

Mine H, Kawai H, Yokoi K, Akaike M, Saito S. High frequencies of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection and presence of HTLV-II proviral DNA in blood donors with anti-thyroid antibodies. *J Mol Med*. 1996 Aug;74(8):471-7.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol*. 1989;7:145-173

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.

Mount SM, Petterson I, Hinterberger M, Karmas A, Steitz JA. The U2 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site *in vitro*. *Cell* 1983;33:509-518.

Mouy, R., Veber, F., Blanche, S., et al. Long-term itraconazole prophylaxis against *Aspergillus* infections in thirty-two patients with chronic granulomatous disease. *J.Pediatr*. 1994;125:998-1003.

Mulholland MW, Delaney JP, Foker JE, Leonard AS, Simmons RL. Gastrointestinal complications of congenital immunodeficiency states. The surgeon's role. *Ann Surg*. 1983 Dec;198(6):673-80.

Mouy R, Veber F, Blanche S, Donadieu J, Brauner R, Levron JC, Griscelli C, Fischer A. Long-term itraconazole prophylaxis against *Aspergillus* infections in thirty-two patients with chronic granulomatous disease. *J.Pediatr*. 1994;125:998-1003.

Murray A. Cell cycle checkpoints. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 Dec;6(6):872-6.

Nagler A, Ackerstein A, Kapelushnik J, Or R, Naparstek E, Slavin S. Donor lymphocyte infusion post-non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant*, 1999;24:339-342.

Nakanishi T, Gu H, Seguchi M, Cragoe EJ Jr, Momma K. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent intracellular pH regulation in the premature myocardium. *Circ Res*. 1992 Dec;71(6):1314-23.

Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon- $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med*. 1983;158:670-689



Nathan C. Interferon and inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. Editors. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, New York: Raven. 2nd ed. 1992, p. 272-331

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

Newburger PE, Luscinskas FW, Ryan T, Beard CJ, Wright J, Platt OS, Simons ER, Tauber AI. Variant chronic granulomatous disease: Modulation of the neutrophil defect by severe infection. *Blood* 1986;68:914-919.

Newburger PE, Malawista SE, Dinauer MC, Gelbart T, Woodman RC, Chada S, Shen Q, Van Blaricom G, Quie PG, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease and glutathione peroxidase deficiency; revisited. *Blood* 1994a;84:3861-3869.

Newburger PE, Skalnik DG, Hopkins PJ, Eklund EA, Curnutte JT. Mutations in the promoter region of the gene for gp91-phox in X-linked chronic granulomatous disease with decreased expression of cytochrome b<sub>558</sub>. *J. Clin. Invest.* 1994b;94:1205-1211.

Noack D, Rae J, Cross AR, Ellis BA, Newburger PE, Curnutte JT, Heyworth PG. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the phagocyte p47-phox: mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes. *Blood*, 2001;97:305-311.

Nunoi H, Iwata M, Tatsuzawa S, Onoe Y, Shimizu S, Kanegasaki S, Matsuda I. AG dinucleotide insertion in a patient with chronic granulomatous disease lacking cytosolic 67-kD protein. *Blood*, 1995;86:329-333.

Nunoi H, Ishibashi F, Mizukami T, Hidaka F. Clinical evaluation of interferon-gamma treatment to chronic granulomatous disease patients with splice site mutations. *Jpn J Infect Dis.* 2004 Oct;57(5):S25-6.

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.

Ogryzlo EA. The nature of singlet oxygen. In Ranby B, Rabeck JF, editors. *Singlet oxygen: reactions with organic compounds and polymers*. New York: John Wiley; 1978. pp. 4-11.

Orkin, SH. Molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Annu. Rev. Immunol.* 1989;7:277-307

Ortega JJ, Sáenz A, Cardelús I, Javier G. Chronic granulomatous disease: clinical and functional studies in six cases. *An Esp Pediatr.* 1980 May;13(5):405-22.

Padgett RA, Konarska M, Grabowski PJ, Hardy SF, Sharp P. A.. Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 1984;225:898-903.

Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler SR, Sharp PA. - Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 1986;55:1119-1550.

Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ. The quaternary structure of the plasma membrane b-type cytochrome of human granulocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Jan 20;932(1):71-83.

Pasic S, Lilic D, Pejnovic N, Vojvodic D, Simic R, Abinun M. Disseminated Bacillus Calmette-Guérin infection in a girl with hyperimmunoglobulin E syndrome. *Acta Paediatr.* 1998 Jun;87(6):702-4.

Patino PJ, Perez JE, Lopez JA, Condino-Neto A, Grumach AS, Botero JH, Curnutte JT, Garcia De Olarte D. Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-phox. *Human Mutation* 1999a;13:29-37.

Patino PJ, Rae J, Noack D, Erickson RW, Ding J, Garcia de Olarte D, Curnutte JT. Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Reduced form) oxidase component p67-phox. *Blood* 1999b;94:2505-2514.

Pellegrini S, Schindler C. Early events in signalling by interferons [published erratum appears in *Trends Biochem. Sci.* 1993 Nov; 18(4):338-342.

Perussia B. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol.* 1991 Feb;3(1):49-55.

Philips MR, Feoktistov A, Pillinger MH, Abramson SB. Translocation of p21rac2 from cytosol to plasma membrane is neither necessary nor sufficient for neutrophil NADPH oxidase activity. *J Biol Chem.* 1995 May 12;270(19):11514-21.

Pikielny CW, Rymond BC, Rosbash M. Electrophoresis of ribonucleoproteins reveals an ordered assembly pathway of yeast splicing complexes. *Nature* 1986;324:341-45.

Pogrebniak HW, Gallin JI, Malech HL, Baker AR, Moskaluk CA, Travis WD, Pass HI. Surgical management of pulmonary infections in chronic granulomatous disease of childhood. *Ann. Thorac. Surg.* 1993;55:844-849.

Rabbani H, De Boer M, Åhlin A, Sundin U, Elinder G, Hammarström L, Palmblad J, Smith CIE, Roos D. A 40-base-pair duplication in the gp91-phox gene leading to X-linked chronic granulomatous disease. *Eur. J. Haematol.* 1993;51:218-222.

Rae J, Newburger PE, Dinauer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, Curnutte JT. X-linked chronic granulomatous disease: Mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of the respiratory burst oxidase. *Am.J.Hum.Genet.* 1998;62:1320-1331.

Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature.* 2002;416(6878):291-297.

Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* 1995;13:151-177.

Renner WR, Johnson JF, Lichtenstein JE, Kirks DR. Esophageal inflammation and stricture: Complication of chronic granulomatous disease of childhood. *Radiology* 1991;178:189-191.

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 Mar;90(3):659-74.

Repine JE, Rasmussen B, White JG. An improved nitroblue tetrazolium test using phorbol myristate acetate-coated coverslips. *Am J Clin Pathol.* 1979;71:582-585.

Revel M, Chebath J. 1986. Interferon activated genes. *Trends Biochem. Sci.* 11:166-70

Revel HR, Ewen ME, Brusslan J, Pagratis N. Generation of cDNA clones of the bacteriophage phi 6 segmented dsRNA genome: characterization and expression of L segment clones. *Virology.* 1986 Dec;155(2):402-17.

Rinderknecht E, O'Connor BH, Rodriguez H. Natural human interferon- $\gamma$ . Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J. Biol. Chem.* 1984;259:6790-6797

Robinson JM, Badwey JA, Karnovsky ML, Karnovsky MJ. Release of superoxide and change in morphology by neutrophils in response to phorbol esters: antagonism by inhibitors of calcium-binding proteins. *J. Cell Biol.* 1985;101:1052-1058.

Roesler J, Hockertz S, Vogt B, Lohmann-Matthes ML. Staphylococci surviving intracellularly in phagocytes from patients suffering from chronic granulomatous disease are killed in vitro by antibiotics encapsulated in liposomes. *J Clin Invest.* 1991 Oct;88(4):1224-9.

Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:227-257

Roos D, Curnutte JT. Chronic Granulomatous Disease. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM editors. Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach; New York: Oxford University Press; 1999. p. 353-374.

Roos D, de Boer M, Borregard N, Bjerrum OW, Valerius NH, Seger RA, Mühlebach T, Belohradsky BH, Weening RS. Chronic granulomatous disease with partial deficiency of cytochrome b558 and incomplete respiratory burst: Variants of the X-linked, cytochrome b558-negative form of the disease. *J.Leukocyte Biol.* 1992;51:164-171.

Roos D, De Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening Rs, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* 1996;87(5):1663-1681.

Roos D, Curnutte JT, Hossle JP, Lau YL, Ariga T, Nunoi H, Dinauer MC, Gahr M, Segal AW, Newburger PE, Giacca M, Keep NH, Van Zwieten R. X-CGDbase: a database of X-CGD-causing mutations. *Immunol. Today* 1996a;17:517-521.

Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* , 1996b;87:1663-1681.

Rosa FM, Cochet MM, Fellous M. Interferon and major histocompatibility complex genes: a model to analyse eukaryotic gene regulation? *Interferon* 1986;7:48-87

Rossi F, Zatti M. Changes in the metabolic pattern of polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Br. J. Exp. Pathol.* 1964;45:548-559.

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH. Cloning the gene for an inherited disorder - chronic granulomatous disease - on the basis of its chromosomal location. *Nature* 1986;322:32-38.

Ruby SW, Abelson J. An early hierarchic role of U1 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Science.* 1988 Nov 18;242(4881):1028-35.

Ruskin B, Krainer AR, Maniatis T, Green MR. Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell.* 1984 Aug;38(1):317-31.

Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8C T cells into cytotoxic CD8C T cells secreting Th1 or T2 cytokines. *Immunity* 1995;2:271-279

Sathyamoorthy M, de Mendez I, Adams AG, Leto TL. p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem.* 1997 Apr 4;272(14):9141-6.

Schapiro BL, Newburger PE, Klempner Ms, Dinauer MC. Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *N.Engl.J.Med*, 1991;325:1786-1790.

Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 1995;64:621–51

Schindler C, Fu XY, Improtta T, Aebersold R, Darnell JE Jr. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon- $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:7836–39

Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4C T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:635–673.

Segal AW, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature.* 1978 Nov 30;276(5687):515-7.

Segal AW, Jones OT, Webster D, Allison AC. Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet.* 1978;2(8087):446-449.

Segal AW, Cross AR, Garcia RC, Borregaard N, Valerius NH, Soothill JF, Jones OTG. Absence of cytochrome b-245 in chronic granulomatous disease. A multicenter European evaluation of its incidence and relevance. *N. Engl. J. Med.* 1983;308:245-251.

Segal AW, Garcia R, Goldstone H, Cross AR, Jones OT. Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochem J.* 1981 Apr 15;196(1):363-7.

Segal AW. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today.* 1996 Mar;2(3):129-35.

Segal BH, Leto TL, Gallin JJ, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 79 2000;(3):170-200.

Seeger RA, Gungor T, Belohradsky BH, Blanche S, Bordigoni P, Di Bartolomeo P, Flood T, Landais P, Müller S, Ozsahin H, Passwell JH, Porta F, Slavin S, Wulffraat N, Zintl F, Nagler A, Cant A, Fischer A. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4344-50.

Seraphin B, Rosbash M. The yeast branchpoint sequence is not required for the formation of a stable U1 snRNP-premRNA complex and is recognized in the absence of U2 snRNA. *EMBOJ.* 1991;10:1209-1216.

Seraphin B, Kretzner L, Rosbash M. A U1 snRNA:pre-mRNA base pairing interaction is required early in yeast spliceosome but does not uniquely define the 5' cleavage site. *EMBOJ*. 1988;25:33-38.

Shatwell KP, Segal AW. NADPH oxidase. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996 Nov;28(11):1191-5.

Sher A, Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T-cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:385-409.

Shurin SB, Cohen HJ, Whitin JC, Newburger PE. Impaired granulocyte superoxide production and prolongation of the respiratory burst due to a low-affinity NADPH-dependent oxidase. *Blood* 1983;62(3):564-71.

Skalnik DG. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. *Gene*. 2002 Feb 6;284(1-2):1-21.

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(25):16736-44.

Skalnik DG. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. *Gene* 2002;284(1-2):1-21.

Sklar LA. Ligand-receptor dynamics and signal amplification in the neutrophil. *Adv Immunol*. 1986;39:95-143.

Speert DP, Bond M, Woodman RC, Curnutte JT. Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: Role of nonoxidative killing by neutrophils in host defense. *J. Infect. Dis*. 1994;170:1524-1531.

Staeheli P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Virus Res*. 1990;38:147-200

Suzuki S, Kumatori A, Haagen IA, Fujii Y, Sadat MA, Jun HL, Tsuji Y, Roos D, Nakamura M. PU.1 as an essential activator for the expression of gp91-phox gene in human peripheral neutrophils, monocytes, and B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1998;95: 6085-6090.

Tanugi-Cholley LC, Issartel JP, Lunardi J, Freycon F, Morel F, Vignais PV. A mutation located at the 5' splice junction sequence of intron 3 in the p67phox gene causes the lack of p67phox mRNA in a patient with chronic granulomatous disease. *Blood*. 1995 Jan 1;85(1):242-9.

Taube H. Mechanism of oxidation with oxygen. *J Gen Physiol*. 1965;49:28-52.

Tauber AI, Borregaard N, Simons ER, Wright J. - Chronic granulomatous disease : A syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine* 1983;62:286-309.

Taylor SJ, Rastall RA, Sykes JT, Winter SC, Bucke C. Primary sequence analysis and representation techniques in carbohydrates. *Comput Appl Biosci*. 1993 Dec;9(6):723-8.

Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature*. 1987 Jun 25-Jul 1;327(6124):720-1.

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

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:251-76.

Tsuji N, Kamagata C, Furuya M, Kobayashi D, Yagihashi A, Morita T, Horita S, Watanabe N. Selection of an internal control gene for quantitation of mRNA in colonic tissues. *Anticancer Res*. 2002 Nov-Dec;22(6C):4173-8.

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 Mar 30;199(3):1378-87.

Uhlinger DJ, Taylor KL, Lambeth JD. p67-phox enhances the binding of p47-phox to the human neutrophil respiratory burst oxidase complex. *J Biol Chem*. 1994 Sep 2;269(35):22095-8.

Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:421-52.

Valente G, Ozmen L, Novelli F, Geuna M, Palestro G, Forni G, Garotta G. Distribution of interferon- $\gamma$  receptor in human tissues. *Eur. J. Immunol*. 1992;22:2403-2412.

Volkman DJ, Buescher ES, Gallin JI, Fauci AS. B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome. *J Immunol*. 1984 Dec;133(6):3006-9.

Volpp BD, Lin Y. In vitro molecular reconstitution of the respiratory burst in B lymphoblasts from p47-phox-deficient chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. 1993;91:201-207.

Voo KS, Skalnik DG. Elf-1 and PU.1 induce expression of gp91(phox) via a promoter element mutated in a subset of chronic granulomatous disease patients. *Blood*. 1999 May 15;93(10):3512-20.

Watling D, Guschin D, Muller M, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Rogers NC, Schindler C, Stark GR, Ihle JN, Kerr IM. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon- signal transduction pathway [see comments]. *Nature* 1993;366:166-170.

Weening RS, Adriaansz LH, Weemaes CMR, Lutter R, Roos D. Clinical differences in chronic granulomatous disease in patients with cytochrome b-negative or cytochrome b-positive neutrophils. *J Pediatr*. 1985;107:102-104.

Weening RS, Leitz GJ, Seger RA. Recombinant human interferon-gamma in patients with chronic granulomatous disease--European follow up study. *Eur J Pediatr*. 1995 Apr;154(4):295-8.

Wheelock EF. Interferon-like virusinhibitorinduced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 1965;149:310-311.

Wilhelm L, McLeary MS, Janner D. MR diagnosis of pulmonary and chest wall aspergillosis as an initial presentation of chronic granulomatous disease in a 7-month-old male. *Pediatr Radiol* 2000;30:719-720.

Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte JT, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs HD, Quie PG, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine* 2000;79:155-169.

Woodman RC, Erickson RW, Rae J, Jaffe HS, Curnutte JT. Prolonged recombinant interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease: evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. *Blood* 1992;79(6):1558-62

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(1):231-41.

Wright KL, White LC, Kelly A, Beck S, Trowsdale J, Ting JP. 1995. Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J Exp Med*. 1995 Apr 1;181(4):1459-71.

Yang KD, Quie PG, Hill HR. Phagocytic System In: Ochs HD, Edvard Smith CI, Puck JM editors. *Primary Immunodeficiency Diseases: A molecular and Genetic Approach*, New York: Oxford; 1999. p82-96.

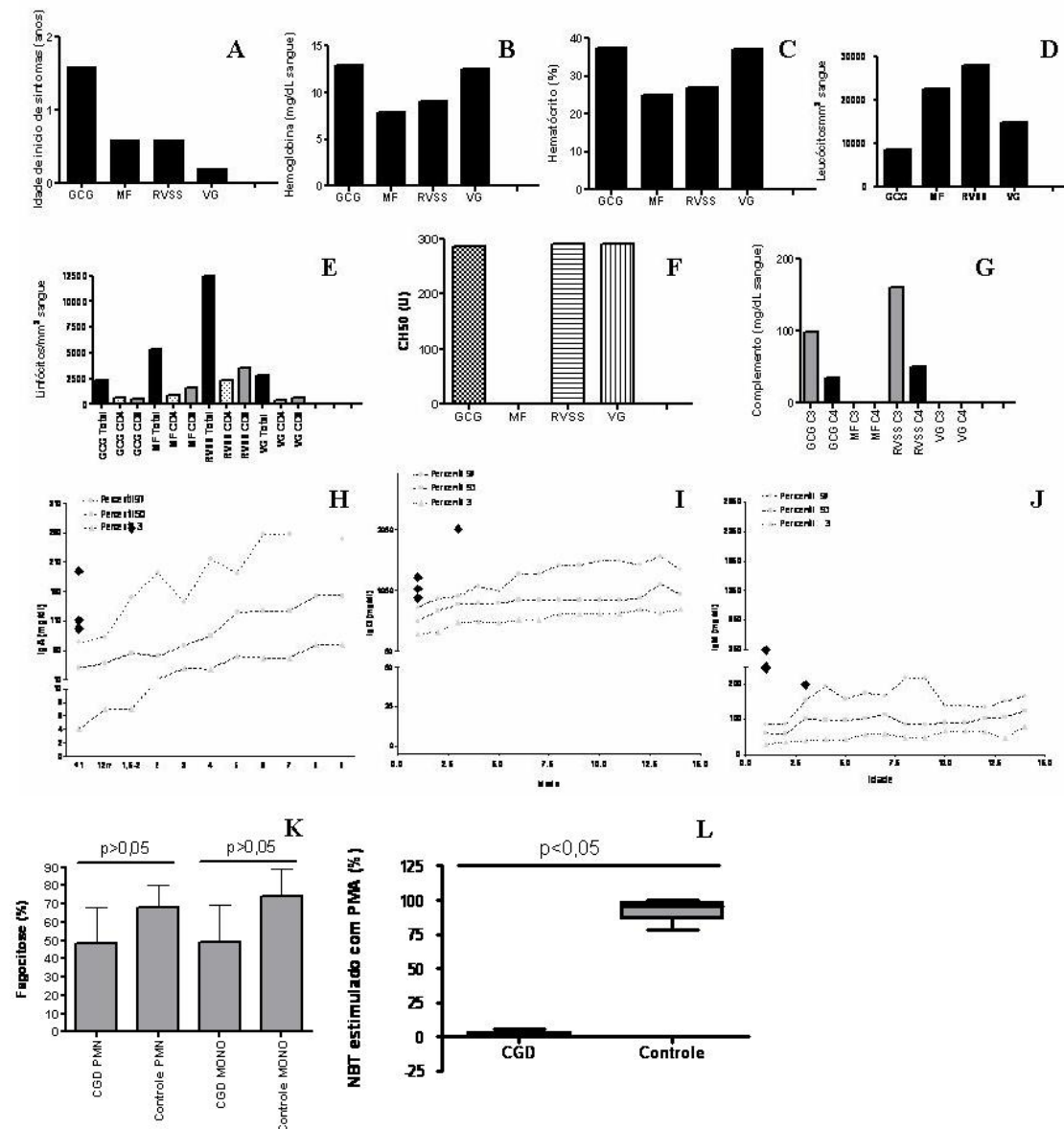


Young HA, Hardy KJ. Role of interferon- in immune cell regulation. *J Leuk Biol.* 1995;58:373–381

Zhan S, Vazquez N, Zhan S, 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(7):2714-21.

**ANEXO A - Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética**

## ANEXO B - Caracterização Clínica e Laboratorial dos Pacientes



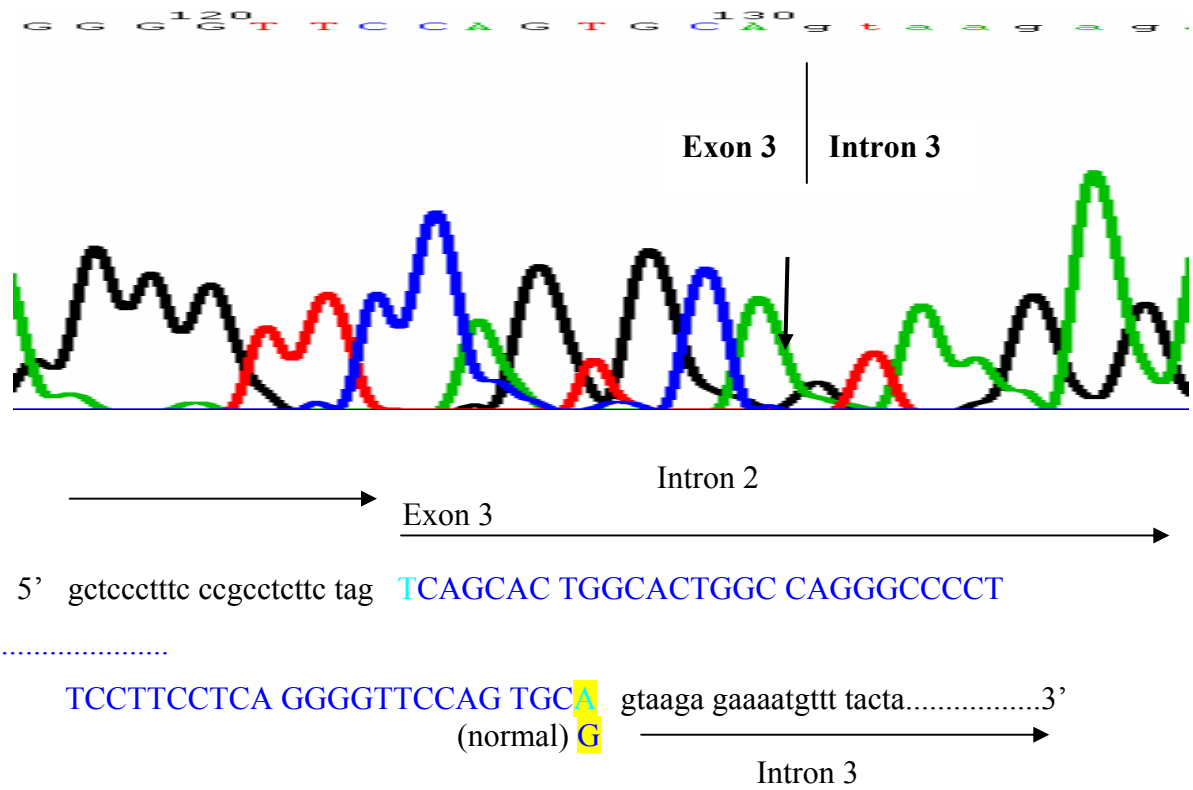
(A) Idade do início da apresentação de sintomas relacionados a DGC. Valores representados em anos. (B) Quantidade de Hemoglobina no sangue periférico de pacientes com DGC. Valores representados em mg/dL de sangue. (C) Hematócrito dos pacientes com DGC. Valores representados em porcentagem. (D) Quantidade de Leucócitos totais no sangue periférico de pacientes com DGC. Valores representados em mm<sup>3</sup>/dL de sangue. (E) Quantidade de Linfócitos Totais e sub-populações linfocitárias CD4+ e CD8+ no sangue periféricos de pacientes com DGC. Valores representados em mm<sup>3</sup>/dL de sangue. (F) Quantificação de unidades de CH50. Valores representados em U. (G) Quantidade proteínas do complemento (C3, C4) no sangue periférico de pacientes com DGC. Valores representados em mg/dL de sangue. (H, I, J) Níveis séricos de Imunoglobulinas em pacientes com DGC: (H) IgA (I) IgG (J) IgM. Valores representados em mg/dL. (K) Avaliação da taxa de fagocitose das células PMN e MONO obtidas a partir de pacientes com DGC e voluntários sadios. Valores representados em porcentagem. (L) Avaliação da redução do NBT a partir de células obtidas do sangue periférico de pacientes com DGC e voluntários sadios (DGC X Controle sadio,  $p < 0,05$ ). Valores representados em porcentagem.

### ANEXO C - Valores de normalidade para os quatro pacientes com DGC

	Hemo globina (mg/dL)	Hemató crito (%)	Leucócitos Totais (mm <sup>3</sup> /dL)	Linfócitos Totais (mm <sup>3</sup> /dL)	Linfócitos CD4+ (Linf/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos CD8+ (Linf/mm <sup>3</sup> )	CH50 (U)	Proteínas do Complemento (mg/dL)	IgA (mg/dL)	IgG (mg/dL)	IgM (mg/dL)
<b>Valores de Normalidade</b>	11 mg/dl	> 38% (para crianças até 12 anos)	11.400 mm <sup>3</sup> /dL	880 - 4.000 mm <sup>3</sup> /dL	1620/mm <sup>3</sup>	1030/mm <sup>3</sup>	100 - 300 U	100 - 300 mg/dL	30 - 55 mg/dL	540 - 820 mg/dL	61-103 mg/dL

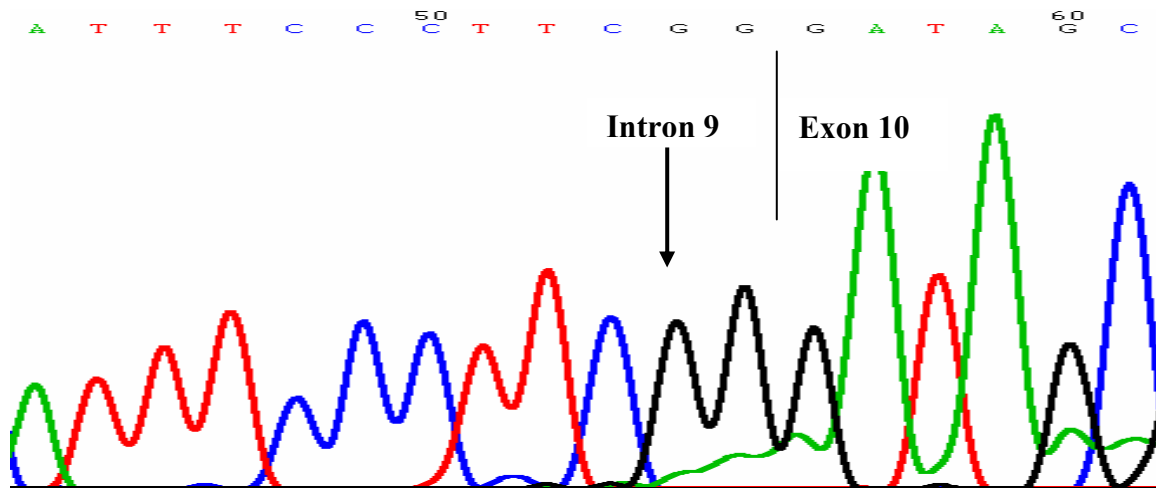
ANEXO D - Sequência do gDNA dos pacientes RVSS e GCG.

Transição hemizigota G>A no sítio do “splicing do Exon 3 do gene *gp91-phox* (AGUDELO-FLOREZ *et. al*, 2005).



**ANEXO E - Seqüência do gDNA do paciente VG.**

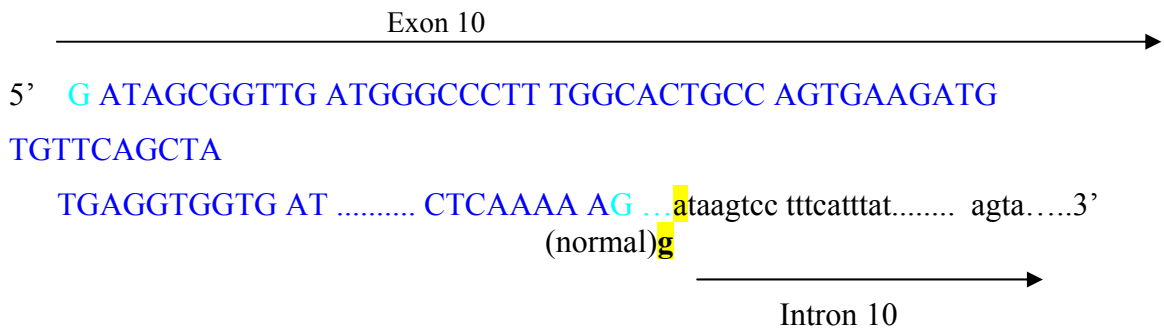
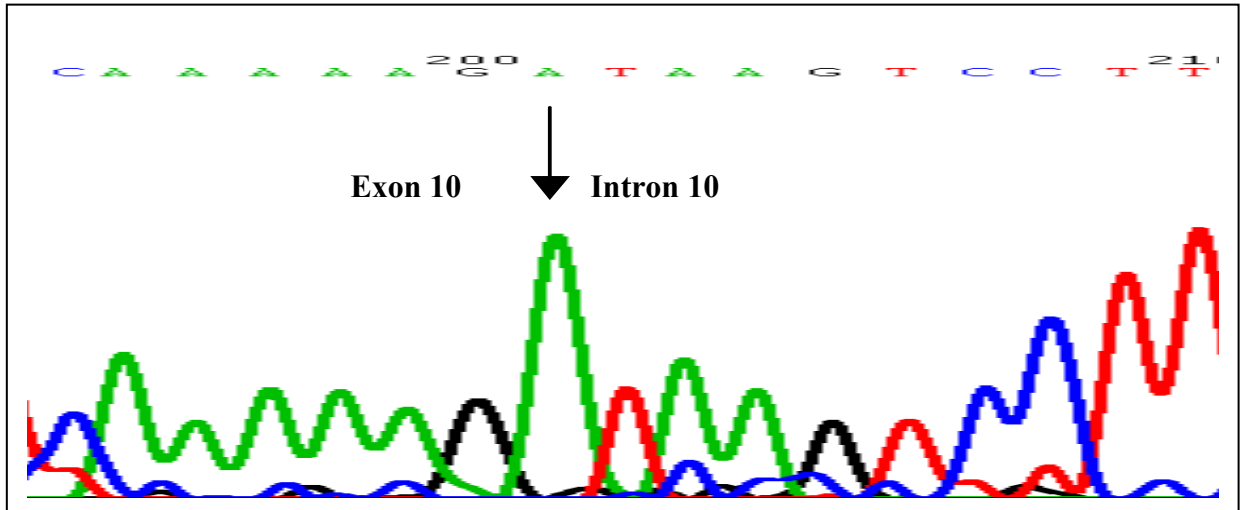
Transição hemizigota A> G no sítio do “splicing” do intron 9. do gene *gp91-phox* (AGUDELO-FLOREZ *et. al*, 2005).



→ Intron 9 Exon 10 →  
 5' cctceccatt tccttc**gg** **G** ATAGCGGTTG ATGGGCCCTT TGGCACTGCC  
 AGTGA.....  
 (normal) **a**  
 AGATG TG TTCAGCTA TGAGGTGGTG ATGTTAGTGG GAGCAGGGAT ..... 3'

## ANEXO F - Seqüência do gDNA dos pacientes VG

Transição hemizigota G > A no sítio de “splicing” do intron 10 do gene *gp91-phox* (HEYWORTH *et al.*, 2001).



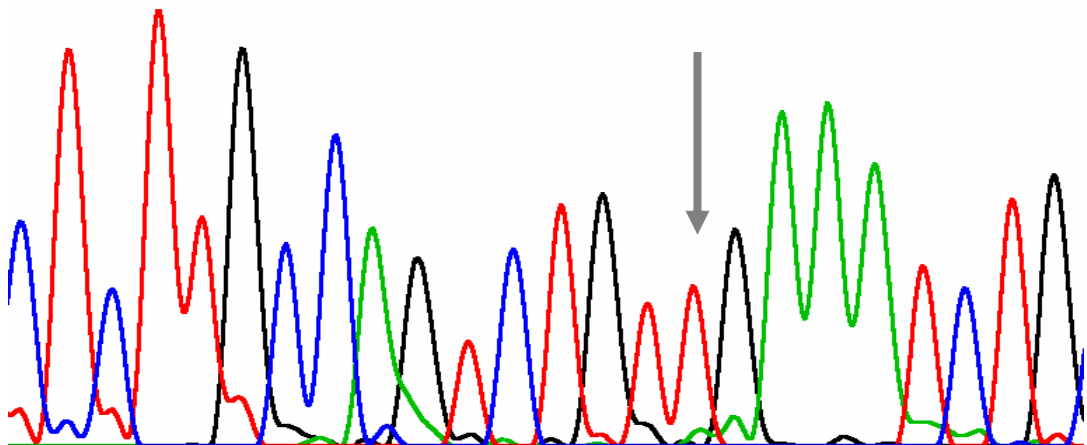
## ANEXO G - Sequência do gDNA dos pacientes MF.

Transição hemizigota C>T na posição c.229, criando um códon de parada no exon 3 (HAYWORTH *et al.*, 2001)

Exon 3: R (Arginina) → Stop codon (73)

	68	69	...	...	72	73	...
	Leu	Leu	...	...	Cys	Arg	...
Ctrl	TCC	ATT	...	...	TGT	CGA	...

	Leu	Leu	...	...	Cys	STOP	...
MF	TCC	ATT	...	...	TGT	TGA	...







# 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](#)