

WALMIR CUTRIM ARAGÃO FILHO

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

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

**Área de concentração:
Imunologia**

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

São Paulo

2009

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

(I κ B α S32A/S36A) demonstrated significantly lower *NCF1* and *NCF2* gene expression compared to control U937 cells. *NCF1* gene expression in EDA-ID S32I cells was decreased compared to normal control cells and similar to autosomal recessive CGD cells due to mutation in *NCF1*. We found a decreased expression of this gene in EDA-ID transformed lineages due to the mutation NEMO/IKK γ X420W. Zymosan phagocytosis was not affected by transfection of U937 cells with the NF- κ B repressor. Electronic searching tools showed the occurrence of two specific sites for p50 and six for p65 in the upstream intergenic region of the *NCF1* gene and one specific site for p50 and two for p65 in the upstream intergenic region of the *NCF2* gene, all evolutionary conserved among the *Macaca mulatta*, *Pan troglodytes* and human genomes. Cells with IFN- γ receptor 1 complete defect (IFNGR1) showed decreased in both basal and IFN- γ -stimulated *NCF1* gene expression. Two distinct IFN- γ receptor 2 complete defects prevent the increase of IFN- γ -stimulated *NCF1* gene expression. Complete and partial IFNGR1 defects also prevent the significant increase of IFN- γ -stimulated *NCF2* gene expression. These studies show that the NF- κ B and the IFNGR1 and INFG2 receptors are necessary for *NCF1* and *NCF2* gene expression and activation of the human NADPH oxidase in this model system.

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Doença Granulomatosa Crônica

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

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

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

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

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

1.3 Estrutura molecular e regulação do gene *CYBB*

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

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

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

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

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

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

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

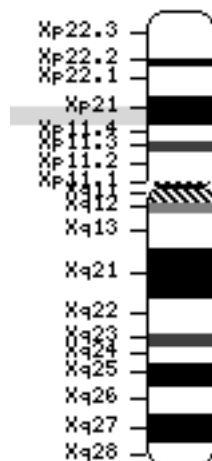


Figura 01. Ideograma com localização esquemática do gene *CYBB* no braço curto do cromossomo X, no segmento Xp21.1.

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

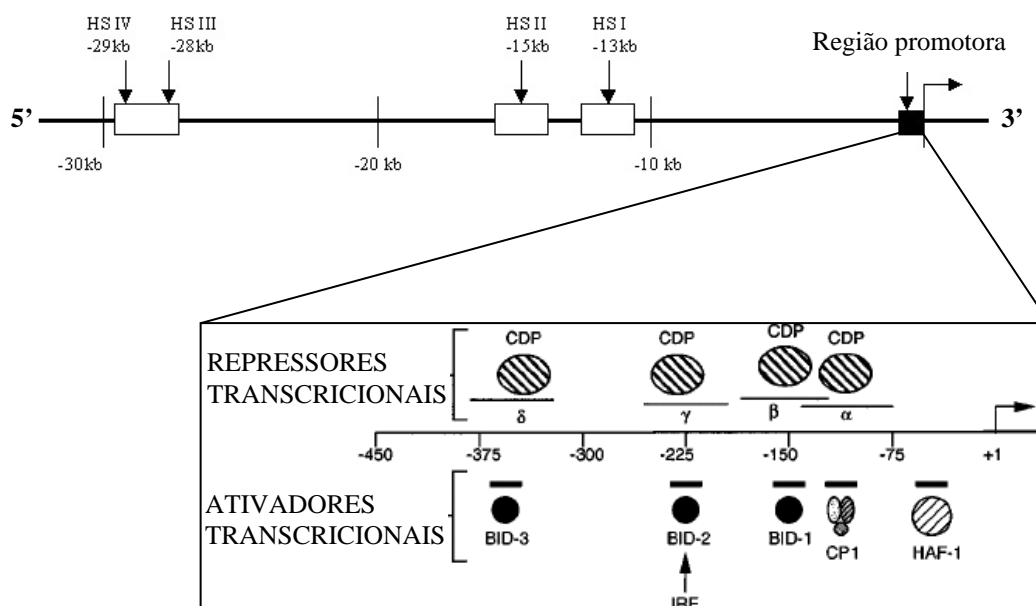


Figura 02. Região promotora do gene *CYBB*. Os repressores transcricionais (CDP) competem com fatores ativadores de transcrição por quatro sítios de ligação dentro da região promotora do gene codificador do componente gp91^{phox} da NADPH oxidase. +1 indica o sítio transcrição inicial. Linhas acima de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

1.4 Estrutura molecular e regulação do gene *CYBA*

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

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



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

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

1.5 Estrutura molecular e regulação do gene *NCF1*

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

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

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

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

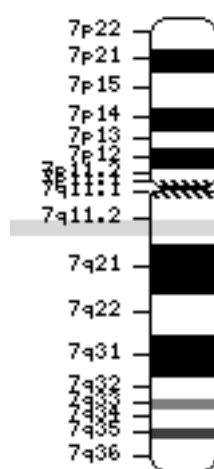


Figura 04. Ideograma com localização esquemática do gene *NCF1* no braço longo do cromossomo 7 humano, na região 7q11.23.

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

1.6 Estrutura molecular e regulação do gene *NCF2*

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

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

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

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

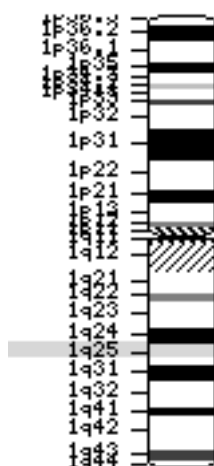


Figura 05. Ideograma com localização esquemática do gene *NCF2* no braço longo do cromossomo 1 humano, na região 1q25.

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

1.7 Estrutura molecular e regulação do gene NCF4

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

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

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

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

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

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

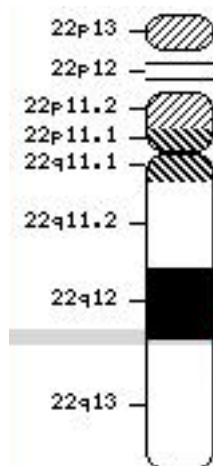


Figura 06. Ideograma com localização esquemática do gene *NCF4* no braço longo do cromossomo 22 humano, na região 22q13.1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.9 Displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID)

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

A maioria dos pacientes possui hipogamaglobulinemia com baixos níveis de IgG sérica, os níveis das outras classes de imunoglobulina (IgA,

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

EDA-ID é uma imunodeficiência grave com significativa morbidade e mortalidade. Infecções recorrentes causam sérias complicações, tais como bronquiectasias, doença pulmonar crônica e diarreia intratável. As características imunológicas e infecciosas dos pacientes resultam de uma resposta celular diminuída dos linfócitos do sangue periférico ao LPS, IL-1 β , IL-18, TNF- α e ao CD40L (Döffinger, et al., 2001). Vias dependentes do NF- κ B também podem estar afetadas nestes pacientes, como a via de ativação dos receptores do tipo “Toll” (TLR) dependentes da ativação do NF- κ B por meio do NEMO (O’neill e Dinarello, 2000).

1.10 Defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ

Anteriormente denominado por Susceptibilidade Mendeliana à Doenças Micobacterianas (referida em Inglês pela sigla MSMD, MIM 209950 (Hamosh, et al., 2005)), o conjunto de doenças originadas a partir da ocorrência de defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ passou a ser referido de acordo com o componente do eixo afetado, conforme mostrado na Tabela 1, adaptado de Geha, et al. (2007). Esta tabela também mostra as células e funções afetadas.

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

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

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

Doença	Células afetadas	Função afetada	Características associadas	Herança	Defeitos genéticos/Patógenes e presumida
Deficiência da cadeia $\beta 1$ do receptor de IL-12 e IL-23	L + NK	Secreção de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AR	Cadeia $\beta 1$ do receptor de <i>IL-12R$\beta 1$</i> : IL-12 e IL-23
Deficiência de IL-12p40	M	Secreção de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AR	Subunidade IL-12p40 de produção de IL-12/IL-23: IL-12/IL-23
Deficiência do receptor 1 do IFN- γ	M + L	Ligação e sinalização de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AR, AD	Cadeia de ligação sinalização <i>IFN-γR1</i> : IFN- γ R
Deficiência do receptor 2 do IFN- γ	M + L	Sinalização de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AR	Cadeia de sinalização <i>IFN-γR2</i> : IFN- γ R
Deficiência de STAT1 (2 formas)	M + L	Sinalização de IFN γ $\alpha/\beta/\gamma$	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> , <i>Salmonella</i> e viroses	AR	<i>STAT1</i>
		Sinalização de IFN- γ	Susceptibilidade a <i>Mycobacteria</i> e <i>Salmonella</i>	AD	<i>STAT1</i>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

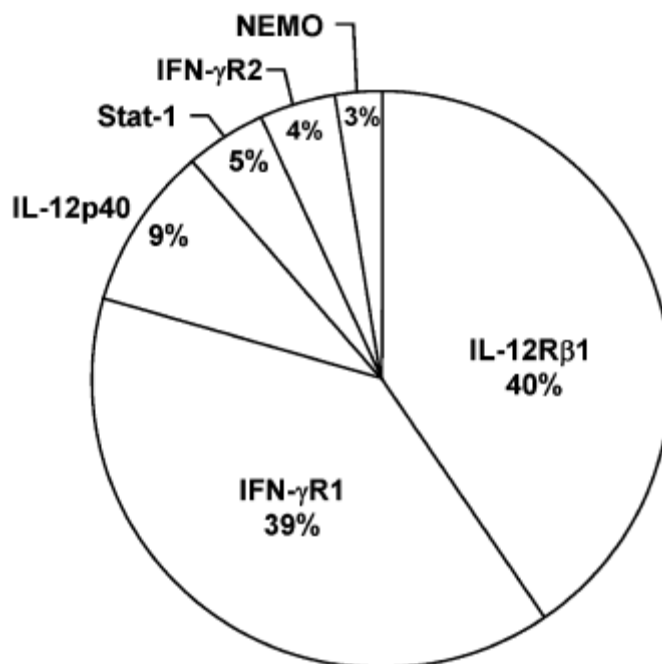


Figura 07. Desordens herdadas conhecidas de defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ . Defeitos genéticos de 220 pacientes com defeito no eixo IL-12/23-IFN- γ , 150 publicados e 70 não publicados. A porcentagem de defeitos nos genes autossômicos (IFNGR1, IFNGR2, STAT1, IL12B, IL12RB1) e ligado ao X (NEMO) está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

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

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

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

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

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

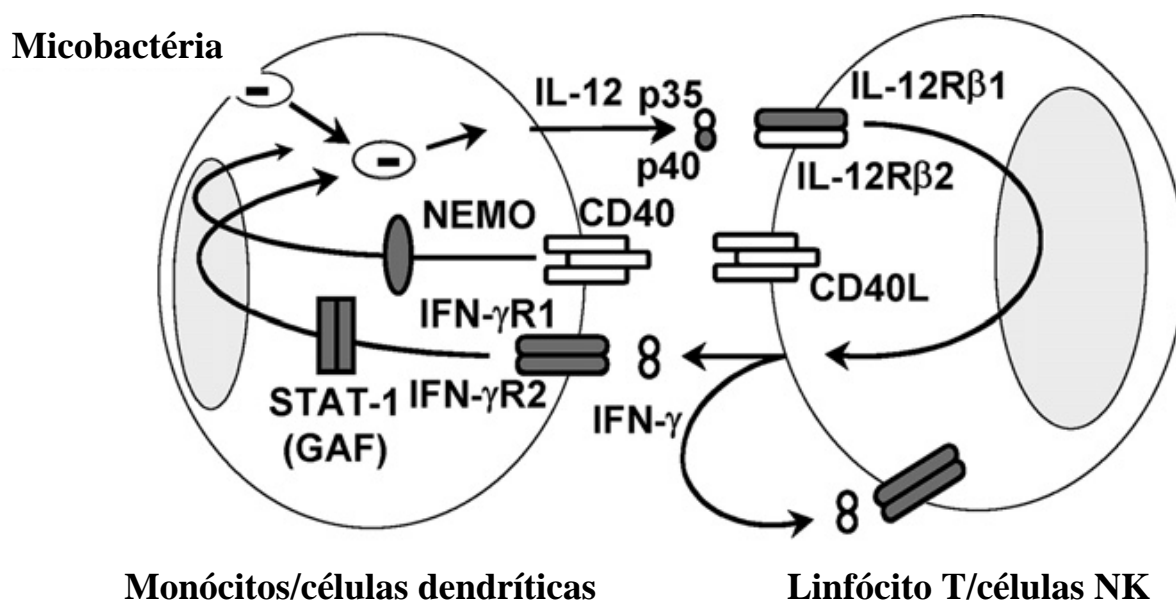


Figura 08. Representação esquemática da produção de citocinas e cooperação entre monócitos/células dendríticas e células NK/T. A interação IL-12/23-IFN- γ e a ativação da via CD40/CD40L correspondente à cooperação entre células T e monócitos/células dendríticas é crucial para a imunidade protetora à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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Abinun M. Ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Arch Dis Child*. 1995;73:185.
- Abinun M, Spickett G, Appleton AL, Flood T, Cant AJ. Anhidrotic ectodermal dysplasia associated with specific antibody deficiency. *Eur J Pediatr*. 1996;155:146-7.
- Aderem A, Underhill DM. Mechanism of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.
- Alcais A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med*. 2005;202:1617-21.
- Altare F, Lammas D, Revy P, Jouanguy E, Döffinger R, Lamhamedi S, et al. Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guérin and Salmonella enteritidis disseminated infection. *J Clin Invest*. 1998a;102:2035-40.
- Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*. 1998b;280:1432-5.
- Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, et al. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:4654-9.
- Ammons MC, Siemsen DW, Nelson-Overton LK, Quinn MT, Gauss KA. Binding of pleomorphic adenoma gene-like 2 to the tumor necrosis factor (TNF)-alpha-responsive region of the NCF2 promoter regulates p67(phox) expression and NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*. 2007;282:17941-52.
- Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem*. 2006;281:5657-67.
- Anumba DO, Robson SC, Boys RJ, Ford GA. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol*. 1999;277:H848-54.

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Condino-Neto A, Newburger PE. NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. *Arch Biochem Biophys*. 1998;360:158-64.

Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood*. 2000;95:3548-54.

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

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

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

Ding AH, Nathan CF. The measurement of cytochrome b559 in polymorphonuclear leukocytes and macrophages in the presence of hemoglobin or mitochondrial cytochromes. *Anal Biochem.* 1988;175:22-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN- γ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Sem Immunol*. 2006b;18:347-61.
- Frix CD III, Bronson DM. Acute miliary tuberculosis in a child with anhidrotic ectodermal dysplasia. *Pediatr Dermatol*. 1986;3:464-67.
- Fujita T, Nolan GP, Ghosh S, Baltimore D. Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF κ B. *Genes Dev*. 1992;6:775-87.
- Fusco F, Pescatore A, Bal E, Ghouli A, Paciolla M, Lioi MB, et al. Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations. *Hum Mutat*. 2008;29:595-604.
- Gabriela G, Loots GG, Ovcharenko I. rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:W217-21.
- Gauss KA, Bunger PL, Quinn MT. AP-1 is essential for p67(phox) promoter activity. *J Leukoc Biol*. 2002;71:163-72.
- Gauss KA, Bunger PL, Larson TC, Young CJ, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, et al. Identification of a novel tumor necrosis factor α -responsive region in the NCF2 promoter. *J Leukoc Biol*. 2005;77:267-78.
- Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Gao Y, DeLeo FR, Quinn MT. Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol*. 2007;82:729-41.
- Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:776-94.
- Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2927-32.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
- Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:837-48.
- Giamis J, Lombard Y, Fonteneau P, Muller CD, Levy R, Makaya-Kumba M, et al. Both mannose and beta glucan receptors are involved in

phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages. *J Leuko Biol.* 1993;54:564-71.

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

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

Guia S, Cognet C, de Beaucoudrey L, Tessmer MS, Jouanguy E, Berger C, et al. A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo. *Blood.* 2008;111:5008-16.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ishibashi F, Mizukami T, Kanegasaki S, Motoda L, Kakinuma R, Endo F, et al. Improved superoxide-generating ability by interferon gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in *CYBB* gene. *Blood*. 2001;98:436-41.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: Identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood*. 1993;82:3183-91.

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

Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C. Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF κ B inhibitor I κ B in vivo. *EMBO J*. 1996;15:6716-26.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Marden CM, Stefanidis D, Cunninghame-Graham DS, Casimir CM. Differentiation-dependent up-regulation of p47(phox) gene transcription is

associated with changes in PU.1 phosphorylation and increased binding affinity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:193-202.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol.* 2002;168:5699-708.

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

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

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

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

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

Pierre-Audigier C, Jouanguy E, Lamhamedi S, Altare F, Raugier J, Vincent V, et al. Fatal disseminated Mycobacterium smegmatis infection in a child with inherited interferon gamma receptor deficiency. *Clin Infect Dis.* 1997;24:982-4.

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

Prando CCM. O papel crucial do eixo IL-12/23-IFN γ para o desenvolvimento e ativação do sistema NADPH oxidase humano. [Tese (Doutorado em Farmacologia)]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2008.

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

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

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

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

Raad H, Paclat MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, et al. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J*. 2008. [Epub ahead of print].

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

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

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

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

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

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

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

Ross GD, Cain JA, Lachmann PJ. Membrane complement receptor type 3 (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin and

functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol.* 1985;134:3307-14.

Roos D, van Zwieten R, Wijnen JT, Gomez-Gallego F, de Boer M, Stevens D, et al. Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase Volendam, leading to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood.* 1999; 94:2955-62.

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

Sadikot RT, Zeng H, Yull FE, Li B, Cheng DS, Kernodle DS, et al. p47phox deficiency impairs NF- κ B activation and host defense in *Peudomonas pneumonia*. *J Immunol.* 2004;172:1801-8.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 alpha-dependent NF-kappa B activity. *J Exp Med*. 2005;201:105-15.

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

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

Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, et al. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood*. 2000;96:1646-54.

Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB JR, Boyle J, Curnutte J, Gallin J I, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79:155-69.

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

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

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

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116:1310-6.

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

Zhan S, Vazquez N, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, et al. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood*. 1996;88:2714-21.

Zhong H, Suyang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF-kB is regulated by the IkB-associated PKAc

subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*. 1997;89:413-24.

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