

MARCOS LUENGO BLANCO

**O PAPEL DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B)
NA EXPRESSÃO DO GENE *CYBB* DO SISTEMA NADPH
OXIDASE HUMANO**

CAMPINAS

Unicamp

2008

MARCOS LUENGO BLANCO

**O PAPEL DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B)
NA EXPRESSÃO DO GENE *CYBB* DO SISTEMA
NADPH OXIDASE HUMANO**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CONDINO NETO

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B598p Blanco, Marcos Luengo
O papel do fator nuclear kappa B (NF-κ B) na expressão do gene
CYBB do sistema NADPH oxidase humano / Marcos Luengo .
Campinas, SP : [s.n.], 2008.

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

1. NADPH Oxidase - análise. 2. Superóxido. 3. .Expressão
gênica 4. Doença Granuomatosa Crônica. 5. Displasia Ectodérmica
Anidrótica. I. Condino Neto, Antonio. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : The role of nuclear factor κ –B (NF- κ B) CYBB gene
expression activity of the human NADPH oxidase system**

Keywords: • NADPH Oxidase - analysis
• Superoxide
• Gene expression
• Chronic Granulomatosis Disease
• Anhidrotic Ectodermal Dysplasia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto
Profa. Dra. Maria Odete Esteves Hilário
Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta
Profa. Dra. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li
Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade

Data da defesa: 02 - 12 - 2008

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Marcos Luengo Blanco

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto

Membros:

Professor (a) Doutor (a) **Maria Odete Esteves Hilário**

Professor (a) Doutor (a) **Luis Eduardo Coelho Andrade**

Professor (a) Doutor (a) **Maria Heloisa Souza Lima Blotta**

Professor (a) Doutor (a) **Lilia Freire Rodrigues de Souza Li**

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/12/2008

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antonio Condino Neto, orientador deste trabalho, a quem agradeço por tudo. Se eu tivesse que enumerar todas as coisas, seguramente faltaria alguma. Portanto é infinita minha gratidão.

A todos os colegas do laboratório, aos quais sempre serei grato pela amizade e pela oportunidade de ter aprendido com todos vocês.

À Jussara Rehder, por quem tenho imensa admiração e respeito, agradeço especialmente - não só pelo apoio técnico - que foi de grande importância, mas também porque sem você não teria concluído esse trabalho. Grato pelo grande companheirismo e amizade, que sempre levarei comigo.

Aos Departamentos de Farmacologia, à Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional da FCM e ao Prof. Douglas do Nascimento, que viabilizaram a elaboração desta tese de doutorado.

	PAG.
RESUMO.....	<i>xii</i>
ABSTRACT.....	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO.....	16
2- OBJETIVOS.....	39
3- JUSTIFICATIVA.....	41
4- CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
5- RESULTADOS.....	51
6- DISCUSSÃO.....	63
7- CONCLUSÃO.....	69
8- REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

.OH	Radical hidroxil
AP-1	Fator de transcrição Proteína Ativadora-1
BID	Binding Increased During Differentiation
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
cDNA	DNA complementar
CEB	Cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein)-binding protein
CYBA	Gene da subunidade a do citocromo b que codifica a porção protéica p22 ^{PHOX}
CYBB	Gene da subunidade b do citocromo b que codifica a porção protéica gp91 ^{PHOX}
DAE/HD	Displasia Anidrótica Ectodérmica/Hipodrótica
DAE-ID	Displasia Anidrótica Ectodérmica com imunodeficiência
DE-ID	Displasia Ectodérmica com imunodeficiência
DEXA	Dexametosona
DG	Displasia Ectodérmica
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNase	Enzima de clivagem de ácidos nucléicos
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDAR	Ectodysplasin A Receptor

EDARADD	EDAR-associated death domain
Elf- 1	E74-like factor 1- Ets domain transcription factor
EMSA super-shift	Electrophoretic mobility shift assay-super-shift.
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Ets	Família de fatores de transcrição Ets
GATA	Fator de transcrição eritróide
GTX	Glitoxina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HAF-1	Hematopoietic-Associated Factor
Hox A	Fatores de transcrição “Homeobox”
IκB	Inibidor kaapa B
IFN-γ	Interferon-gama
IKK	Complexo IκB quinase
ILs	Interleucinas
Kb	Kilobases
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NCF1	Gene que codifica o fator 1 citosólico de neutrófilos, que codifica a porção protéica p47 ^{PHOX}
NCF2	Gene que codifica o fator 2 citosólico de neutrófilos, que codifica a porção protéica p67 ^{PHOX}
NCF4	Gene que codifica o fator 4 citosólico de neutrófilos, que codifica a porção protéica p40 ^{PHOX}
NEMO/IKK	NF-κB-essential modulator
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico

NOS	Óxido nítrico sintase
O^{·-}	Radical Superóxido
pb	pares de bases
PBS	Tampão fostato salino
Pbx1	“Pre-B-cell leukemia transcription factor 1”
PCR	Polimerase chain reaction = Reação de polimerização em cadeia
PHOX	phagocyte oxidase = Fagócito oxidase
PKC	Proteína quinase c
PMA	Acetato de forbol miristato
PU.1	Fator de transcrição PU.1
Rap1	Ras related protein A
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reverse transcription polimerase chain reaction = Transcrição reversa com reação de polimerização em cadeia
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
STAT	Signal Transducers and Activator of Transcription
TAE	Tris acetato 0,04M+ EDTA 0,001M
TATA box	TATA-binding protein = Sequência de consenso típica das TATA de região promotora
TBP	TATA-binding protein
TFIID	Transcription factor II D
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Ativação sistema NADPH oxidase.....	21
Figura 2- Possível seqüência de ligação do NF- κ B ao sítio “HSII” (DNase I hypersensitive site) dentro da região transcritora do gene <i>CYBB</i>	27
Figura 3- Vias de ativação do NF- κ B.....	31
Figura 4- Inativação farmacológica das vias de ativação do NF- κ B.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1A- Liberação de ânion superóxido por células U937.....	52
Gráfico 1B- Liberação de ânion superóxido por células U937pMCV3.....	53
Gráfico 1C- Liberação de ânion superóxido por células U937 pMCV3-IκBM.....	54
Gráfico 2- Liberação de ânion superóxido por células B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica e Imunodeficiência (EBV-DAE-IDκB S32I e DAE-ID/ NEMO/IKKγ X420W), comparados com linfócitos B-EBV de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC), com mutação ligada ao X (X91°).....	55
Gráfico 3A- Expressão relativa do gene <i>CYBB</i> (PCR em tempo real) por células U93.....	57
Gráfico 3B- Expressão relativa do gene <i>CYBB</i> (PCR em tempo real) por células U937pMCV3.....	58
Gráfico 3C- Expressão relativa do gene <i>CYBB</i> (PCR em tempo real) por células U937 pMCV3-IκBM.....	59
Gráfico 4- Expressão relativa do gene <i>CYBB</i> (PCR em tempo real) por células B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica com Imunodeficiência (EBV-DAE-IDκB S32I e DAE-ID/ NEMO/IKKγ X420W) comparada a células B-EBV de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC), com mutação ligada ao X (X91°).....	60

Gráfico 5-	Ensaio eletroforético da mobilidade de super complexo (EMSA supershift) do heterodímero NF- κ B com seqüências consenso NF κ B da região transcritora do gene do <i>CYBB</i> (5'... CGA TAA GGG GCT TTC CTG TTC A... 3'), em células monocíticas humanas U937, U937pMCV3 ou U937pMCV3-I κ BM.....	61
Gráfico 6-	Ensaio eletroforético da mobilidade de supercomplexo (EMSA supershift) de NF- κ B com seqüências consenso de ligação específica.....	62

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se o papel funcional de fator nuclear kappa B (NF- κ B), sobre a regulação do gene *CYBB* e, conseqüentemente, a influência que esse fator exerce sobre o desenvolvimento do sistema NADPH oxidase humano.

Células mielocíticas da linhagem U937 transformadas com um vetor carregando o gene repressor de, NF- κ B (I- κ B α -S32A/ S36A) demonstraram uma redução na liberação de ânion superóxido e uma diminuição nos níveis de expressão do gene *CYBB* comparado ao grupo controle de células U937 selvagens.

Em paralelo, os mesmos parâmetros foram avaliados em linfócitos B de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica com Imunodeficiência (DAE-ID) transformadas com vírus de Epstein-Barr (EBV), (EBV-DAE-ID κ B S32I e DAE-ID NEMO/IKK γ X420W), e células de um paciente portador de Doença Granulomatosa Crônica (DGC), com mutação ligada ao X (EBV-DGC-X91°). Esses experimentos também mostraram os mesmos efeitos inibidores da atividade NADPH oxidase, assim como a redução dos níveis de expressão do gene *CYBB*.

Os ensaios de EMSA supershift (anti-p50 humano) demonstraram ausência da ligação do complexo protéico à seqüência consenso para NF- κ B 5' do gene do *CYBB*, confirmando o bloqueio da translocação deste fator para o interior do compartimento nuclear das células U937 transformadas e das células EBV-DAE-ID κ B S32I e DAE-ID NEMO/IKK γ X420W.

Diante destes resultados, conclui-se que o NF- κ B é necessário para a ativação da expressão do gene *CYBB* e conseqüentemente para o desenvolvimento do sistema NADPH oxidase de fagócitos humanos.

ABSTRACT

This work investigated the functional role of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in respiratory burst activity and in expression of the human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase gene *CYBB*. U937 cells with a stably transfected repressor of NF- κ B (I- κ B α -S32A/ S36A) demonstrated significantly lower superoxide release and lower *CYBB* gene expression compared with control U937 cells.

We further tested Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells from patients with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency (EDAID), an inherited disorder of NF- κ B function (DAE-ID I κ B S32I e DAE-ID NEMO/IKK γ X420W). Superoxide release and *CYBB* gene expression by EDA-ID cells were significantly decreased compared with healthy cells and similar to cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease (X91° CGD).

Gel shift assays demonstrated loss of recombinant human p50 binding to a NF- κ B site 5' to the *CYBB* gene in U937 cells treated with NF- κ B inhibitors, repressor-transfected U937 cells, and EDA-ID patients' cells.

These studies show that NF- κ B is necessary for *CYBB* gene expression and activation of the phagocyte NADPH oxidase in this model system.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Espécies reativas do oxigênio envolvidas na defesa imunológica

Até a década de 80, as espécies reativas de oxigênio (EROs) eram consideradas agentes tóxicos capazes de produzir modificações oxidativas irreversíveis, alterando o equilíbrio bioquímico celular de forma letal. Entretanto, nos últimos anos, as EROs vêm ganhando um novo papel nos sistemas biológicos, uma vez que vários estudos têm mostrado que elas podem atuar em diversas funções fisiológicas, entre elas, a fagocitose. Nesse ambiente, os radicais livres possuem uma importante função nas atividades microbicida, tumoricida e inflamatória (Henderson e Chappel, 1996; Chanock et al., 1994). O fagossoma se forma por meio de uma série de complexos eventos de fusão de endossomas e lisossomas. Nos fagolisossomas, ocorre uma forte acidificação intravesicular, através da geração de EROs, propiciando a ativação de enzimas proteolíticas lisossomais como hidrolases ácidas responsáveis pela quebra de restos intra e extracelulares, destruição de microrganismos fagocitados e produção de nutrientes. (Underhill e Ozinsky, 2002). No entanto, recentes evidências indicam que, além da produção de espécies reativas do oxigênio, substâncias oxidantes e, conseqüentemente, a ativação de proteases, também depende da atividade fisiológica de carreadores de íons potássio e cálcio presentes nas membranas de grânulos fagocitários (Reeves et al., 2003). Estudos realizados por Reeves et al. (2002) mostraram que o acúmulo aniônico no interior do vacúolo lisossomal é compensado por um fluxo de íons potássio que cruzam a membrana de forma pH-dependente. Estes canais são abertos pela combinação de despolarização de membrana e elevada concentração de íons cálcio, como conseqüência de atividade da oxidase (Ahluwalia et al., 2004), gerando a liberação de proteínas granulares catiônicas, incluindo elastase e catepsina G, entre outras. Portanto, o movimento de compensação iônica possibilita as condições para atividade microbicida realizadas pelas enzimas liberadas nos grânulos citoplásmicos (Segal, 2005; Segal, 2006).

Consideram-se como espécies reativas de oxigênio todas aquelas moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo, com alta capacidade oxidativa. Figuram entre as EROs, os radicais livres superóxido ($O^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$), e as espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO). (Kohen e Nyska, 2002).

Sob circunstâncias controladas, a formação de EROs se inicia pela redução incompleta do oxigênio molecular por alguns complexos enzimáticos, que incluem a xantina oxidase (converte xantinas em ácido úrico), óxido nítrico sintase (NOS), ciclooxygenase, NADPH oxidase (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato) e o citocromo P450, assim como por vias mitocondriais (Cohen et al., 1994). A produção destes radicais livres é dependente de diversos mediadores com seus respectivos receptores, presentes na membrana celular, desencadeando uma série de eventos moleculares, principalmente alterações na expressão gênica (Babior, 2000).

1.2- O sistema NADPH oxidase

A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ou sistema NADPH oxidase compreende um complexo enzimático gerador de superóxido formando um pequeno sistema aceptor de elétrons transmembrana, o que resulta na oxidação do NADPH na superfície citoplasmática e na geração de reativos oxidantes, em uma variedade de células de origem mesodérmica. Este sistema está bem estudado em leucócitos, particularmente em fagócitos profissionais e linfócitos. Sbarra e Karnovsky (1960) demonstraram as primeiras evidências da existência de uma entidade enzimática inicialmente em neutrófilos, (Nauseef, 2004) e o conhecimento sobre os componentes do sistema NADPH oxidase, seus genes e suas relações estruturais avançou dramaticamente (Babior, 1999). Ao longo deste tempo, foi demonstrado que a atividade enzimática deste sistema é realizada por um arranjo multiprotéico formado por cinco subunidades: p40^{PHOX} (PHOX “**p**hagocyte **o**xidase”), p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p22^{PHOX} e gp91^{PHOX}. Em estado de repouso celular, três destes cinco componentes p40^{PHOX}, p47^{PHOX} e p67^{PHOX} permanecem no citosol de forma complexada formando um heterotrímero. (Babior, 2004). Os outros dois componentes p22^{PHOX} e gp91^{PHOX} estão localizados na membrana plasmática (aproximadamente 5%) e na membrana e grânulos intracelulares (aproximadamente 95%), em que aparecem como uma flavoproteína conhecida como citocromo b558, que desempenha o papel de doador terminal de elétrons ao oxigênio (Dahlgren e Karlsson, 1999). O flavocitocromo b₅₅₈ é um heterodímero constituído por duas subunidades α e β , compostas por uma glicoproteína de

91 kDa, (gp91^{PHOX}) e por um polipeptídeo não glicosilado de 22 kDa, denominado p22^{PHOX} (Parkos et al., 1987).

Os genes que expressam as respectivas subunidades do complexo NADPH oxidase são:

Genes	Produto protéico
<i>CYBA</i> (Gene da subunidade a do citocromo b)	p22 ^{PHOX}
<i>CYBB</i> (Gene da subunidade b do citocromo b)	gp91 ^{PHOX}
<i>NCF1</i> (Gene que codifica o fator 1 citosólico de neutrófilos)	p47 ^{PHOX}
<i>NCF2</i> (Gene que codifica o fator 2 citosólico de neutrófilos)	p67 ^{PHOX}
<i>NCF4</i> (Gene que codifica o fator 4 citosólico de neutrófilos)	p40 ^{PHOX}

Os estudos sobre a especificidade tissular e expressão dos genes que codificam este heterodímero mostram que o gene que codifica o componente gp91^{PHOX} se expressa restritamente em células mielóides e o gene que codifica a porção p22^{PHOX} se expressa constitutivamente em várias linhagens celulares (Royer-Pokora et al., 1986; Parkos et al., 1988). A expressão coordenada destes genes acompanha a diferenciação de células mielóides, sendo contínua até a morte destas (Skalnik, 2002).

A ativação do sistema NADPH oxidase leucocitário requer o deslocamento de seus componentes que se apresentam distribuídos entre compartimentos celulares distintos, o que garante que a oxidase esteja inativa nas células em repouso (não estimuladas) (Babior, 1999). Esta ativação requer a participação não somente destas subunidades, mas também de duas outras proteínas de baixo peso molecular ligantes de nucleotídeos de guanina. A Rac2 que, em células no estado de repouso, está localizada no citoplasma formando um complexo dimérico com sua molécula inibidora Rho-GDI (“Guanidine nucleotide Dissociation Inhibitor”) e a Rap1A, que está presente na membrana, a qual pertence à superfamília Ras ligante de GTP, responsáveis pela regulação de diversas vias de transdução de sinais, ciclo celular e translocação de proteínas

(Heyworth et al., 1993). Em resposta a uma grande variedade de mediadores extracelulares, o componente citosólico $p47^{PHOX}$ é fosforilado e o complexo citosólico inteiro migra para a membrana, sendo associado com o citocromo b_{558} para montar a forma ativa da NADPH-oxidase.

A Rac2 liga-se a uma molécula de GTP (trifosfato de guanosina) e, em seguida, essa molécula liga-se a uma região rica em resíduos de prolina, seguida por um domínio SH3 C-terminal da $p67^{PHOX}$ produzindo, assim, a migração do complexo citosólico ($p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$, $p67^{PHOX}$ e Rac2) associada pelas interações diretas dos resíduos de prolina e SH3. Dessa maneira, ocorre a migração deste complexo para a membrana, integrando-se ao citocromo b_{558} (Diekmann et al., 1994). A função da Rac2, nesta interação, parece estar relacionada à estabilização da $p67^{PHOX}$ em relação à complexação final com os outros componentes (Burg e Pillinger, 2001), enquanto a Rap1 é incorporada ao citocromo b_{558} , os quais são liberados à superfície celular pela fusão das membranas das vesículas secretoras (Babior, 1999). Aparentemente, a presença de Rap1 no desenvolvimento do sistema NADPH, oxidase parece ter ação moduladora desta ativação, como foi demonstrado por Segal et al., em (2000). Segundo estes autores, a fosforilação da Rap1 pode inibir a atividade da oxidase, uma vez que é desfeita a associação com citocromo b_{558} .

A figura abaixo mostra um diagrama representativo do sistema NADPH oxidase com seus componentes citoplasmáticos e membranosos.

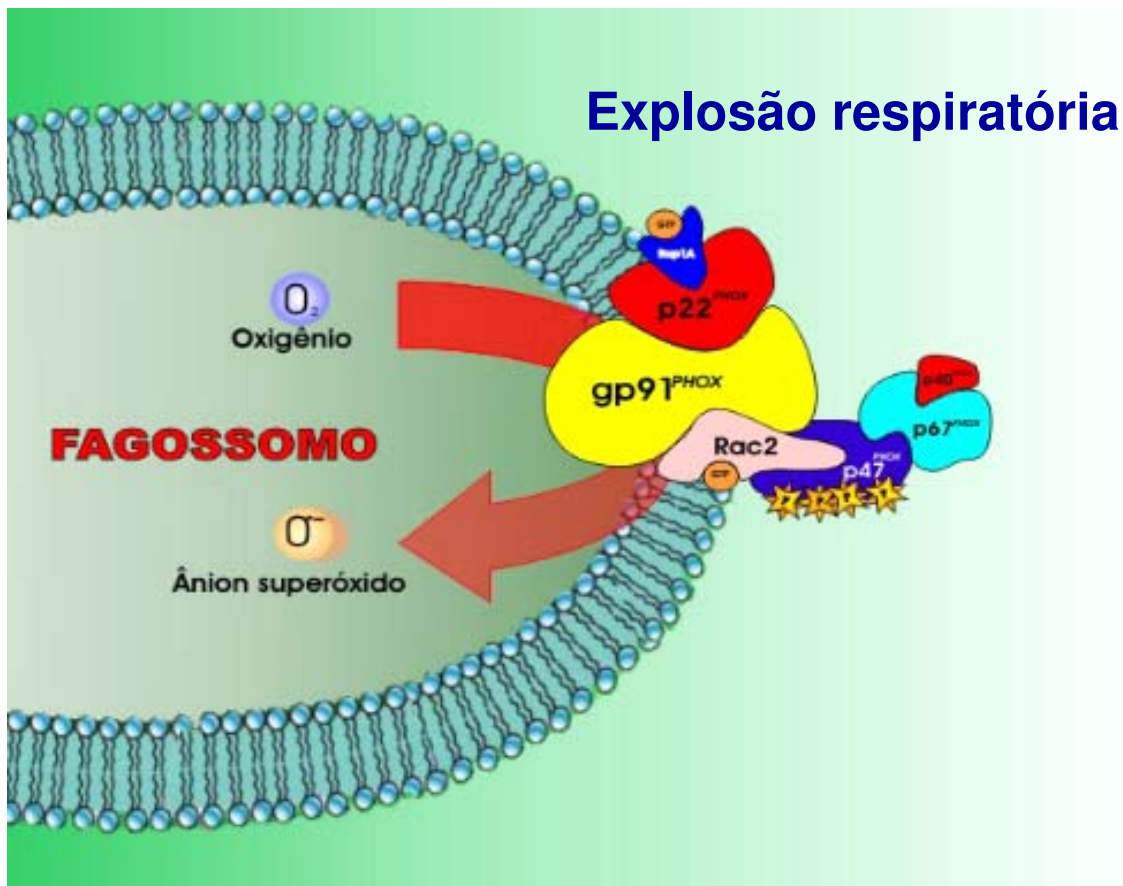


Figura 1- Ativação sistema NADPH oxidase. (Luengo-Blanco, 2008).

O sistema NADPH-oxidase ativado é então capaz de transferir elétrons e catalisar a redução do oxigênio molecular com gasto de NADPH. Quando a fagocitose ocorre, a membrana plasmática é internalizada com a parede do fagossoma, produzindo a face interna desta vesícula fagocítica. Com esta localização, o complexo enzimático gera o superóxido, o primeiro produto da explosão respiratória, dentro do fagossoma. A fusão da membrana do fagossoma com a membrana plasmática resulta também na liberação de superóxido no meio extracelular (Dahlgren e Karlsson, 1999; Babior, 2000).

A importância do sistema NADPH oxidase como mecanismo microbicida pôde ser evidenciado através do conhecimento da Doença Granulomatosa Crônica (DGC) (Holmes et al., 1967).

1.3- Doença granulomatosa crônica

A DGC na infância foi descrita como uma entidade clínica em 1957, a qual acometia crianças do sexo masculino com pneumonia, linfadenite e abscessos localizados em diferentes áreas (Berendes et al., 1957; Bridges et al., 1959). Essa doença caracteriza-se clinicamente como imunodeficiência grave e rara (incidência estimada de 1/250.000 nascidos vivos por ano), de manifestação precoce, na qual os quadros infecciosos por bactérias como *Staphylococcus aureus*, bacilos gram-negativos e fungos como *Aspergillus*, *Candida* e *Nocardia* ocorrem predominantemente em locais considerados barreiras naturais do organismo (Segal et al., 1983; Tauber et al., 1983). Desta maneira, o paciente apresenta infecções graves e recidivantes na pele, vias respiratórias, trato gastrointestinal e respectivos linfonodos que drenam essas áreas. Outros órgãos afetados são: fígado, ossos, sistema nervoso central e pâncreas (Forrest et al., 1988; Segal et al., 2000).

As primeiras descrições da DGC surgiram em 1967 como uma forma fatal de granulomatose que acometia indivíduos do sexo masculino. (Quie et al., 1967). Windhorst et al. (1967) mostraram haver um distúrbio na atividade microbicida de fagócitos profissionais destes indivíduos. Esses mesmos autores também realizaram estudos com a família destes indivíduos e estabeleceram uma herança recessiva ligada ao cromossomo X. Baehner e Nathan (1967) demonstraram um defeito na atividade oxidase de leucócitos de indivíduos portadores de DGC, mostrando que estes leucócitos não reduzem o corante nitroazul tetrazolim (NBT), utilizado para avaliar a capacidade oxidativa dos leucócitos durante a fagocitose.

Os defeitos moleculares da DGC residem na ausência, baixa expressão ou mau funcionamento de um dos componentes do sistema NADPH oxidase. Os fagócitos, tais como os macrófagos, eosinófilos e neutrófilos possuem ancorado na membrana interna um

complexo protéico denominado sistema NADPH oxidase que, durante a fagocitose e na dependência de um grande consumo de oxigênio, produzem superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio, responsáveis pela atividade microbicida, tumoricida e inflamatória (Chanock et al., 1994; Holmes et al., 1967; Henderson e Chappel, 1996).

Na forma DGC ligada ao sexo, é afetada a cadeia pesada do citocromo b558, o componente gp91^{PHOX} (Eklund et al., 2000), enquanto que nas formas autossômicas recessivas é afetado um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, respectivamente a p47^{PHOX} ou p67^{PHOX} (Clark et al., 1999), ou ainda a cadeia leve do citocromo b₅₅₈, o componente p22^{PHOX} (Parkos et al., 1988). Com base nestes achados, a classificação atual da DGC baseia-se nos defeitos moleculares específicos (Baehner et al., 1986; Segal e Abo, 1993; Woodman et al., 1995; Condino-Neto e Newburger, 2000).

Dentre os defeitos gênicos dos pacientes com DGC, ocorrem deleções, inserções e substituições, nas quais a maior parte dos pacientes apresenta mutações exclusivas de suas famílias. A diversidade destas mutações e os múltiplos genes afetados constituem uma explicação para a heterogeneidade clínica e genética da DGC (Heyworth et al., 2003), em que o estudo das células dos pacientes com DGC, além de ilustrar a relevância clínica dos reativos intermediários do oxigênio, possibilitou a identificação dos diversos componentes da NADPH oxidase e seus mecanismos de ativação (Dinauer et al., 1990; Ding e Nathan 1988).

Os pacientes portadores de DGC sofrem inúmeros processos infecciosos muitas vezes letais, decorrentes de defeitos em subunidades protéicas do sistema NADPH oxidase (p22^{PHOX}, p47^{PHOX} ou p67^{PHOX}), que impedem a ocorrência do processo da explosão respiratória (El-Benna et al., 2005). Esses defeitos são capazes de bloquear alguns eventos importantes na ativação da NADPH-oxidase como a fosforilação da p47^{PHOX} e a subsequente translocação dos componentes citosólicos para a membrana plasmática (Nauseef et al., 1991). A forma mais comum de DGC é causada por um defeito na gp91^{PHOX} que tem padrão hereditário ligado ao cromossomo X (X-DGC, 56%), (Dinauer et al., 1987; Winkelstein et al., 2000), seguida pelas formas autossômicas recessivas por alteração na p47^{PHOX} (A47-DGC, 30%), p22^{PHOX} (A22-DGC, 5 a 7%) e p67^{PHOX} (A67-DGC, 5 a 7%). (Parkos et al., 1988; Dinauer et al., 1987; Clark et al., 1990

Winkelstein et al., 2000). Diversas mutações e polimorfismos gênicos foram descritos ao longo destes anos após a descoberta da doença, cujo conhecimento está possibilitando elucidar os mecanismos moleculares da fisiopatologia deste distúrbio. (Newburger, 1998; Winkelstein et al., 2000; Heyworth, et al., 2001; Heyworth, et al., 2003; Agudelo-Florez et al., 2006; Leiva et al., 2007).

O estudo das bases moleculares do sistema NADPH oxidase vem sendo desbravado nos últimos anos funcionando como uma ferramenta para a compreensão da complexidade dos mecanismos que regem este sistema, possibilitando, assim, a investigação dos mecanismos da expressão gênica dos componentes da oxidase.

O componente gp91^{PHOX} do sistema NADPH oxidase é codificado pelo gene *CYBB* (cadeia beta do citocromo *b*₅₅₈). Este gene, por ter sido exaustivamente estudado, tornou-se um modelo interessante para ilustrar a complexidade dos mecanismos moleculares do sistema NADPH oxidase e adotou-se como referência de estudo de transcrição célula-específica (Skalnik, 2002) e é também freqüentemente usado para avaliar a diferenciação fase-específica de células mielóides, por ser ativamente expresso após estágio promielocítico. (Royer-Pokora et al., 1986; Leto et al., 1990).

Este gene está localizado no braço curto do cromossomo X no segmento Xp21.1 (Baehner et al., 1986), expressa-se restritamente em células mielóides (Clark, 1999), no qual ocupa aproximadamente 30kb do DNA genômico e contém 13 éxons, os quais variam de 0,7 a 7kb em tamanho (Skalnik et al., 1991). A análise estrutural da região proximal de 1,5 kb do flanco 5' terminal revela uma seqüência de pares de bases CCCAAT duplicada entre -106 e -124 nt (numeração proximal ao sítio de início de transcrição), bem como uma região TATA não consensual em -30 pares de bases (Skalnik et al., 1991).

1.4- Regulação transcricional do sistema NADPH oxidase humano

Vários trabalhos na literatura investigaram os mecanismos de regulação transcricional do gene *CYBB* (Kautz et al., 2001). Recentemente, foram propostos alguns mecanismos repressores e ativadores da região promotora deste gene, o qual possui elementos cis, positivos e negativos, que interagem com múltiplos fatores de transcrição,

tais como: STAT-1 (“Signal Transducers and Activator of Transcription”), CDP (“coactivator CREB-binding protein”, (Eklund et al., 2000; Hawkins et al., 2001) e Pbx1 (“pre-B-cell transcription homeobox factor 1”), expressos constitutivamente em células indiferenciadas (Eklund et al., 2000; Neufeld et al., 1992).

Na diferenciação terminal do mielócito, a expressão das proteínas repressoras é reduzida, permitindo, assim, a ligação de proteínas ativadoras como é o caso dos fatores da família Ets (fatores transcrpcionais requeridos no desenvolvimento de diversas células da linhagem hematopoética), como, por exemplo, a PU.1 (Proteína homóloga da subfamília SPI, “Spi-B transcription factor Spi-1/PU.1”) e Elf- 1 (“E74-like factor 1- Ets domain transcription factor”) (Woodman et al., 1995). Outros elementos trans ativadores induzidos por IFN- γ (interferon-gama) também são necessários para a ativação da transcrição do gene *CYBB* (Eklund et al., 1998; Eklund e Kakar, 1999; Skalnik, 2002), como é o caso do HAF-1 (“Hematopoietic-Associated Factor”). Este fator restrito é necessário, mas não suficiente, para a indução da transcrição do componente gp91^{PHOX} em células hematopoéticas estimuladas com IFN- γ (Eklund e Skalnik, 1995). Estudos adicionais (Eklund et al., 1996) demonstraram três elementos entre –450 e –100 pares de bases da região promotora do gene *CYBB* que não compartilham nenhuma seqüência consensual, mas que possuem atividade ligante ao DNA, sendo denominadas BID-1, 2 e 3 (“Binding Increased During Differentiation”), incluindo nesta região cis-elementos que regulam a iniciação da transcrição do gene *CYBB* em resposta ao estímulo de IFN- γ (interferon-gama) e o fator de necrose de tumoral (TNF-alfa), em diferentes linhagens de células mielóides (Lindsey et al., 2007). Recentemente, o envolvimento dos fatores de transcrição “Homeobox” (Hox A) vem sendo mais ativamente estudado (Bei et al, 2005).

De forma geral, os genes são controlados a partir de sua região regulatória 5’ ou promotora, posicionada nos primeiros 300 pares de bases iniciando tipicamente com o “TATA-box” que não favorecem a ligação a TBP (“TATA-binding protein”), um componente-chave do fator de transcrição II D (TFIID, transcription factor II D). Em cooperação com outros TFIs e fatores gerais de transcrição, o TFIID forma com a RNA polimerase II, o complexo de transcrição importante para sua ativação.

Além do promotor, o DNA flanqueador 5' de um gene também possui elementos localizados mais distalmente que se ligam a fatores mais específicos de transcrição que podem atuar independentemente da orientação. (Pugh, 2000). Esses elementos são denominados “enhancers” e podem estar localizados a uma grande distância do gene por eles regulados, ou estar contidos em íntrons. Sabe-se hoje que a distinção entre o promotor e o “enhancer” é menos nítida do que se supunha anteriormente. (Lewandoski, 2001). Os fatores de transcrição quando reconhecem seqüências específicas de DNA presentes nos “enhancers” modulam as atividades dos elementos cis. Podem ser também classificados como fatores co-ativadores e co-repressores que não requerem interação direta com DNA e são recrutados para ativar ou reprimir a expressão gênica. (Rosenfeld et al, 2006).

A análise da maquinaria transcricional de um gene refere-se à delimitação da região regulatória e à caracterização ou identificação dos fatores transcricionais que nela atuam. Para obter essas informações, a transcrição pode ser avaliada quanto ao fato de ser dependente ou não de um determinado fator de transcrição, com o uso de sistemas de promotor/repórter, nos quais fragmentos da seqüência flanqueadora 5' são ligados a um gene heterólogo. Posteriormente, o refinamento da localização dos elementos cis é feito com técnicas de “footprinting” que pode ser realizado com uso de DNase I, uma enzima que se liga à curvatura menor da dupla hélice do DNA e corta a ligação fosfodiéster de ambas as fitas independentemente (Galas e Schmitz, 1978). Trata-se de uma molécula relativamente grande, o que a impede de atacar a parte do DNA que está muito próxima dos limites da ligação DNA-proteína. Esta propriedade faz com que, na maioria das vezes, o “footprint” de um fator nuclear com a DNase I seja maior do que a área real que esta proteína protege e posteriormente as interações específicas DNA-proteína são estudadas por experimentos de retardo da mobilidade na eletroforese (Brenowitz, et al., 1986).

Estudos de “footprinting” com DNase I, realizados na região “upstream” do gene *CYBB*, demonstraram a presença de uma região hipersensível distante da 5' flanqueadora com aproximadamente -15kb de distância da região promotora do gene (Thain, et al., 2008 submetido e em revisão - Journal of Biological Chemistry). Os resultados deste estudo sugeriram a presença de uma seqüência consenso para o fator nuclear kappa B (NF-κB) nesta região.

A figura abaixo mostra a possível sequência de ligação do NF-κB ao sítio “HSII” (DNase I hypersensitive site) dentro da região flanqueadora 5’ do gene *CYBB*. 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 *gp91^{PHOX}*. +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 de transcrição denotam correspondência a DNase I footprints.

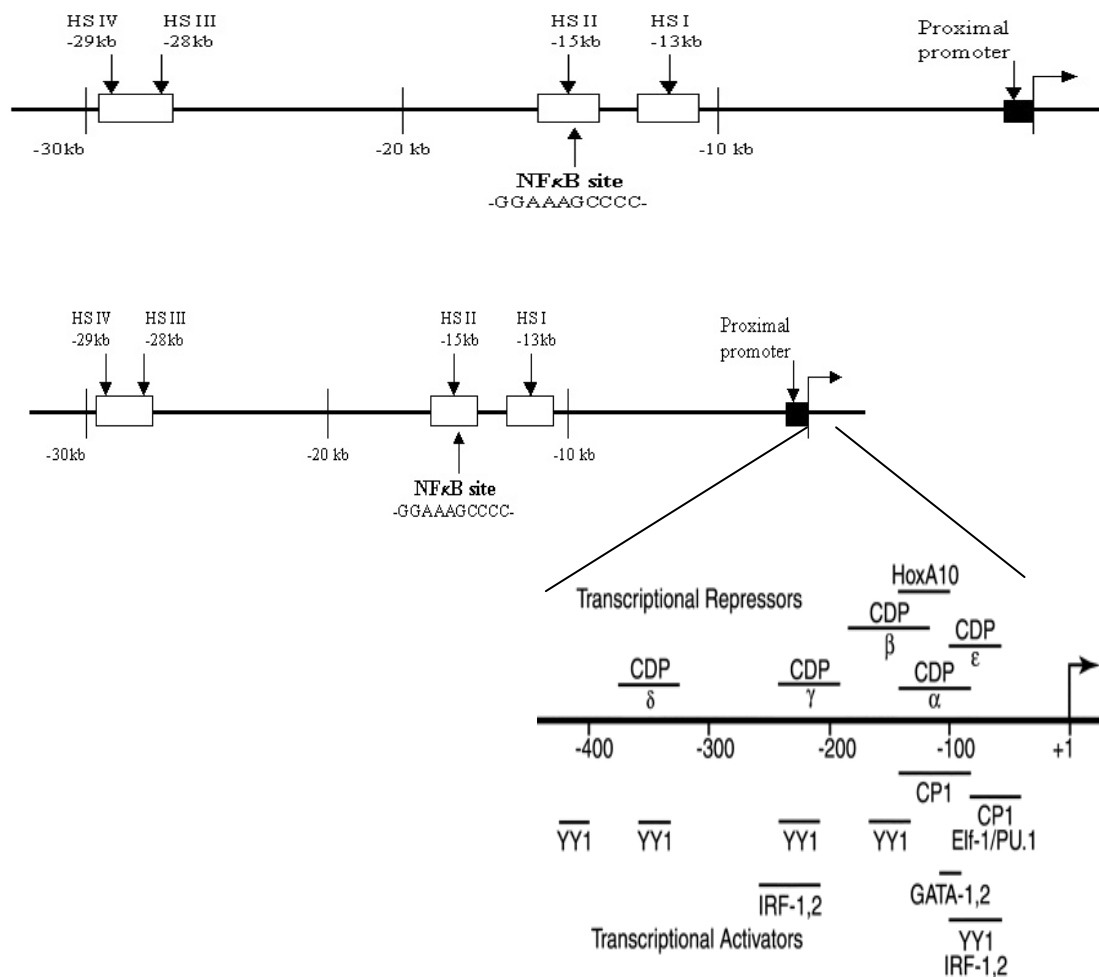


Figura 2- Possível sequência de ligação do NF-κB ao sítio “HSII” (DNase I hypersensitive site) dentro da região transcritora do gene *CYBB*. (modificado de Luo e Skalnik, 1996a; Luo e Skalnik, 1996b).

1.3- Fator nuclear kappa B

O fator nuclear kappa B foi descrito por Sem e Baltimore em (1986) como uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B.

Atualmente, sabe-se que este fator pode modular a transcrição de genes ligados à resposta imunológica (Li e Verma, 2002), tais como: citocinas IL- 1, 2, 6, 8, TNF- α , INF- α e β , anti-apoptóticos, TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1, c-IAP2, o fator de crescimento GM-CSF (Stein e Yang, 1995; Baldwin Jr, 1996; Gerritsen et al.,1997; Wang et al., 1998), moléculas de adesão, MAd-CAM-1, ELAM-1, ICAM-1, VCAM; enzimas como cicloxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase (NOS), os quais promovem a expressão de mais de 150 genes em resposta à inflamação, à infecção viral e bacteriana. (Baeuerle e Henkel, 1994; Pahl, 1999; Lawrence e Bebbien, 2007).

Genes que regulam a resposta imunológica inata como as proteínas envolvidas no complexo de histocompatibilidade também participam como co-estimuladores de moléculas que são essenciais na indução da imunidade específica como as interleucinas 2, 12, e interferon, assim como outros elementos que regulam a proliferação e diferenciação linfocitária (Yamamoto e Gaynor, 2001) e que NF- κ B também regula a expressão de uma variedade de proteínas que inibem a apoptose conduzindo o controle da proliferação e sobrevivência celular. Nesse sentido, qualquer irregularidade deste fator contribui para a alteração dos processos de divisão celular e carcinogênese. (Karin et al., 2002; Skalnik, 2002).

O NF- κ B é uma proteína dimérica, cujos monômeros pertencem à família das proteínas Rel/NF- κ B. Essa família é constituída por cinco proteínas: c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1(p105 que é transformada por proteólise em p50) e NF- κ B2 (p105 que é transformada por proteólise em p52). Todos os dímeros apresentam um domínio comum chamado de RHD (“Rel-homology domain”), que é responsável pela dimerização, ligação com o DNA e interação com a proteína inibidora de NF- κ B. (McKay e Cidlowski 1999, Hoffmann, 2006). A forma mais frequente deste fator é formada pelo heterodímero composto por duas subunidades, uma proteína de 50 kDa, chamada de p50 ou NF- κ B1 e

uma outra de 65 kDa, chamada de p65 ou RelA, as quais representam o protótipo clássico do NF- κ B. (Karin e Ben-Neriah, 2000; Karin e Lin, 2002). Em outros tipos celulares não-leucocitários ou células de outros organismos, como de insetos, estes dímeros podem ocorrer de outras formas promovendo diversas combinações heterodiméricas como, por exemplo: p50/p52, p50/p105, p100/p529, e, provavelmente, combinações homodiméricas em células de mamíferos (p50/p50) (Fujita et al., 1992; Moore et al., 1993).

Logo após a identificação do NF- κ B, Baeuerle e Baltimore (1988) identificaram outra proteína de 60 a 70 kDa de atividade inibitória chamada de I κ B, que especificamente associa-se a dímeros de NF- κ B, formando trímeros (p50/p65/ I κ B) e impedindo que o NF- κ B se ligue ao DNA quando dentro do núcleo. Além disso, essa forma trimérica obriga a retenção deste complexo no citoplasma (Rice et al., 1992; Verma e Stevenson, 1997; Baldwin, 1996). Na década passada, 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 , Bcl-3), entre outras (Haskill et al., 1991; Inoue et al., 1992). A atividade dos complexos Rel/NF- κ B é regulada pela interação com os membros da família de inibidores I κ B, os quais interagem com a sequência de localização nuclear, localizada na porção carboxi-terminal do domínio RHD das subunidades de NF- κ B, inibindo a translocação do fator de transcrição do citoplasma para o núcleo e a ligação do heterodímero ao DNA (Garcia-Piñere et al., 2004).

1.3.1- Ativação fisiológica do sistema NF- κ B

O NF- κ B pode ser ativado por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1, fatores ativadores de linfócitos T e B, LPS bacteriano, proteínas virais, fatores de crescimento e fatores indutores de estresse físico e fisiológico como as radiações UV e gama, além de inúmeros agentes químicos (Brown et al., 1995; Carlsen et al., 2002). Outra via de ativação do NF- κ B ocorre por quando há o reconhecimento de moléculas expressas por diversos microrganismos ao se ligarem aos receptores do tipo Toll identificado em células da linhagem linfóide e mielóide de origem murina ou humana. A ativação dos receptores Toll induz a transdução de sinal

resultando na ativação de MAP kinases e NF- κ B (Medzhitov, 2001), o que pode levar à perda da expressão de CD62L na superfície de granulócitos e/ou síntese terminal de citocinas pró-inflamatórias, especialmente de TNF. (Deering e Orange, 2006).

Apesar da enorme diversidade de indutores descritos para NF- κ B, a principal via de indução ocorre por meio de ativação do complexo I κ B quinase (IKK), pertencente ao grupo das proteínas da família MAPK (“mitogen activated protein kinase”) (Garcia-Piñere et al., 2004).

O complexo IKK, que contém dois sítios catalíticos, IKK- α e IKK- β , e uma unidade regulatória conhecida como NEMO (“NF- κ B-essential modulator”) (Kim et al., 2003). Com a ativação da IKK, ocorre a fosforilação da I κ B nos resíduos de aminoácidos serina 32 e 36. O I κ B fosforilado sofre ubiquitinação pelo complexo ligase-proteína-ubiquitina e em seguida a porção inibitória I κ B é degradada pelo complexo proteossoma 26S (Karin e Ben-Neriah, 2000 Traenckner et al., 1994; Krappmann et al., 1996; Didonato et al., 1997, Mercúrio et al., 1997; Verma e Setevenson, 1997), permitindo o transporte do NF- κ B livre ou ativo até o invólucro nuclear e sua ligação específica com a sequência consenso de nucleotídeos, desencadeando os processos auxiliares da maquinaria de controle de expressão gênica que vão induzir a fosforilação de RNA polimerase II, dando início à transcrição (Garcia-Piñere et al., 2001; Brown et al., 1995). Outras enzimas podem também causar a fosforilação de outros aminoácidos do NF- κ B, como um mecanismo indireto de ativação. Embora esse mecanismo não seja muito bem compreendido, alguns autores relatam que, após a fosforilação da serina 276, da subunidade p65, aumenta a atividade transcricional do NF- κ B (Zhong et al., 1997; Tak e Firestein, 2001). Além da fosforilação, o NF- κ B pode sofrer acetilação ou outras modificações pós-translacionais. A acetilação impede que o NF- κ B se ligue novamente ao I κ B, determinando maior tempo de permanência no compartimento interno nuclear (Chen et al., 2001). Porém a transcrição dirigida por NF- κ B é específica e está associada a um tipo específico celular, mas os mecanismos que determinam a transcrição de um ou outro grupo de genes ainda não foram esclarecidos (Garcia-Piñere et al., 2004). Gauss et al. (2007) mostraram que a ativação de NF- κ B

mediada por TNF, conduz a um aumento da expressão dos genes *CYBB*, *NFC1* e *NCF2* e conseqüentemente produção de superóxido em fagócitos humanos.

Segue abaixo uma figura que ilustra os principais eventos moleculares de ativação do o NF- κ B em células do sistema imunológico.

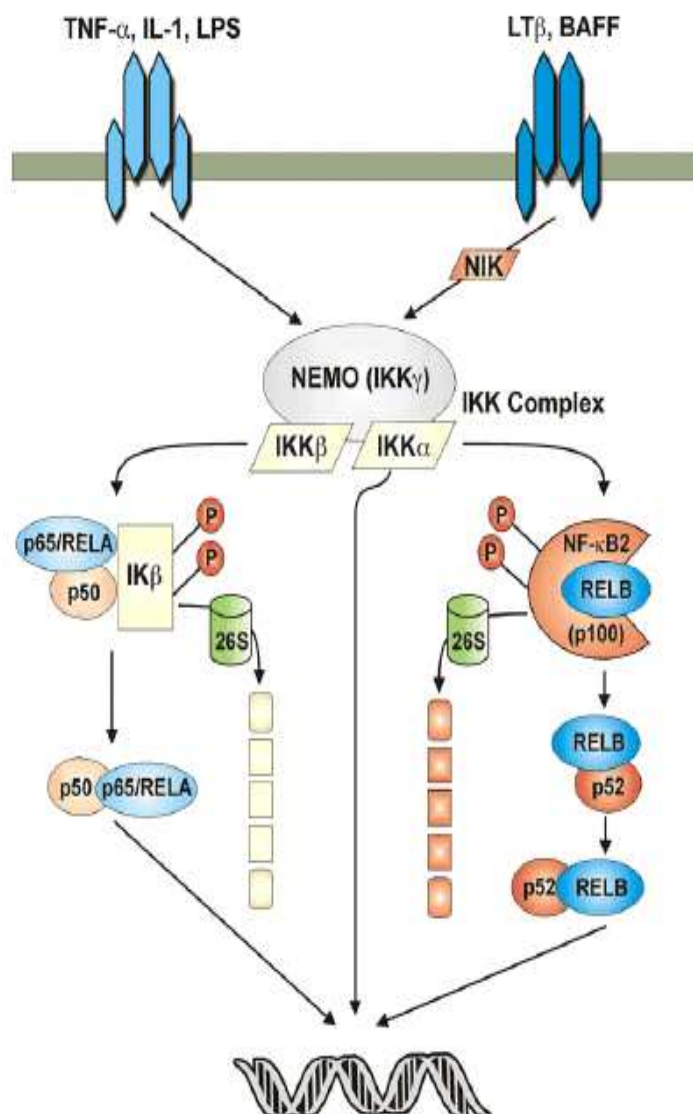


Figura 3- Vias de ativação do NF- κ B.

1.3.2- Intervenção farmacológica na atividade NF- κ B

A inibição farmacológica do NF- κ B pode ser obtida pela ação de diversos agentes capazes de bloquear os mecanismos transduccionais envolvidos na fosforilação da I κ B através da inatividade do complexo NEMO/IKK ou inibindo a atividade do proteossoma, impedindo, assim, que o I κ B seja degradado. Grande parte destes inibidores é constituído pelos agentes antiinflamatórios hormonais e não hormonais tais como: salicilatos, indometacina, meloxicam, glicocorticóides, entre outros, com mecanismos de ação bem relatados na literatura (D'Acquisto et al., 2002).

Após a descoberta que o AAS é um inibidor de NF- κ B, vários grupos de pesquisa começaram a investigar se outras substâncias farmacológicas desta mesma classe também possuíam o mesmo efeito inibitório deste fator em concentrações compatíveis dos já utilizados na terapêutica, visto que outros antiinflamatórios não hormonais como sulfasalazina, trifusal, ibuprofeno, tepoxalina, indometacina também são inibidores de NF- κ B. (D'Acquisto et al., 2002 ; Lee et al., 2006; Noh et al., 2006). Alguns fármacos (AINES) como a indometacina e os salicilatos inibem a atividade do NF- κ B que controla a expressão dos genes de ciclooxigenase 2 e ciclina D1 (Takada et al., 2004). Atualmente, trabalhos da literatura abordam a inibição do NF- κ B como um dos mecanismos de ação de fármacos AINES (D'Acquisto et al., 2002; Amann e Peskar, 2002), por bloquearem os mecanismos de fosforilação da I κ B, inibindo o sítio de ligação da IKK β , suprimindo a expressão dos genes de ciclooxigenase 2 e ciclina D1 (Takada et al., 2004).

Os glicocorticóides e os corticosteróides são amplamente utilizados como antiinflamatórios e imunossupressores e também são inibidores de NF- κ B. Os glicocorticóides se ligam com receptores citoplasmáticos específicos para glicocorticóides (RGs). Essas complexações funcionam como segundos mensageiros ativando a expressão de genes também envolvidos na resposta imunológica sempre quando ocorre a ligação de cortisol endógeno, promovendo assim os mecanismos endócrinos. Os glicocorticóides sintéticos como a dexametasona e hidrocortisona, por sua vez, ligam-se aos RGs com afinidade semelhante aos hormônios endógenos, tornando-se complexos de alta afinidade de ligação com o DNA. O complexo penetra no núcleo, ligando-se em promotores gênicos

específicos, ocasionando a indução da transcrição destes genes (Leung e Bloom, 2000; Pujols et al., 2004; Ito et al., 2006)

Um dos mecanismos dos glicocorticóides é que estes podem ativar a transcrição da I κ B, especificamente a I κ B β , molécula responsável por manter o NF- κ B inativo no citoplasma promovendo, a inibição deste fator de transcrição por impedir a translocação deste fator para o núcleo, sua inibição. (D'Acquisto et al., 2002). Além deste mecanismo, outros também foram descritos como a inibição antagônica por interações proteína-proteína dentro do núcleo, em que o receptor de glicocorticóide liga-se ao NF- κ B, impedindo que o fator se ligue ao sítio específico do DNA (Almawi, 2002), seqüestrando a porção p65 associada à PKAc (Doucas, 2000), inibindo a fosforilação da RNA polimerase II (Nissen e Yamamoto, 2000) ou inibindo o NF- κ B associado à atividade histona acetiltransferase pela via histona desacetilase (Ito, 2001). Os glicocorticóides também apresentam efeitos específicos sobre resposta em resposta por citocinas, como: INF- γ , do GM-CSF, das interleucinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10 e do TNF- α (Bessler et al., 1999; Crinelli et al., 2000; Liu e Wang, 2000).

Collado-Escobar e Mollinedo (1994) e Cox (1995) demonstraram que os glicocorticóides inibem a liberação de superóxido em vários modelos experimentais, porém a regulação gênica deste processo foi investigada por Condino-Neto et al., (1998) em células mielóides da linhagem THP-1 diferenciadas com citocinas e tratadas dexametasona, que foi capaz de inibir a liberação de superóxido, em parte pela inibição da transcrição do gene *CYBB*, quando administrada antes das citocinas (Condino-Neto et al., 1998).

Vários grupos de pesquisa começaram a investigar quais outras substâncias farmacológicas também possuíam o mesmo efeito inibitório deste fator em concentrações compatíveis com os já utilizados na terapêutica. Outra classe de agentes inibidores são as substâncias antioxidantes devido às suas propriedades de induzir uma redução dos agentes que causam o estresse oxidativo e, conseqüentemente, impedindo a ativação do fator kappa B. Dentre estas substâncias destacam-se a N-acetilcisteína, diidrocarbamato de pirrolidona e as vitaminas C e E. Alguns compostos naturais extraídos de vegetais e microrganismos também apresentam atividade inibitória sobre o NF- κ B. Nesta classe, sobressaem-se,

principalmente, os compostos fitoquímicos medicinais como o resveratrol, um polifenol antioxidante encontrado no vinho tinto. Entre os de origem microbiana, destacam-se principalmente a ciclosporina A, a lactocistina, a gliotoxina fúngica, entre outras. O mecanismo geral desta classe é de promover a interrupção do proteossoma (D'Acquisto et al., 2002). Como mostra a ilustração abaixo:

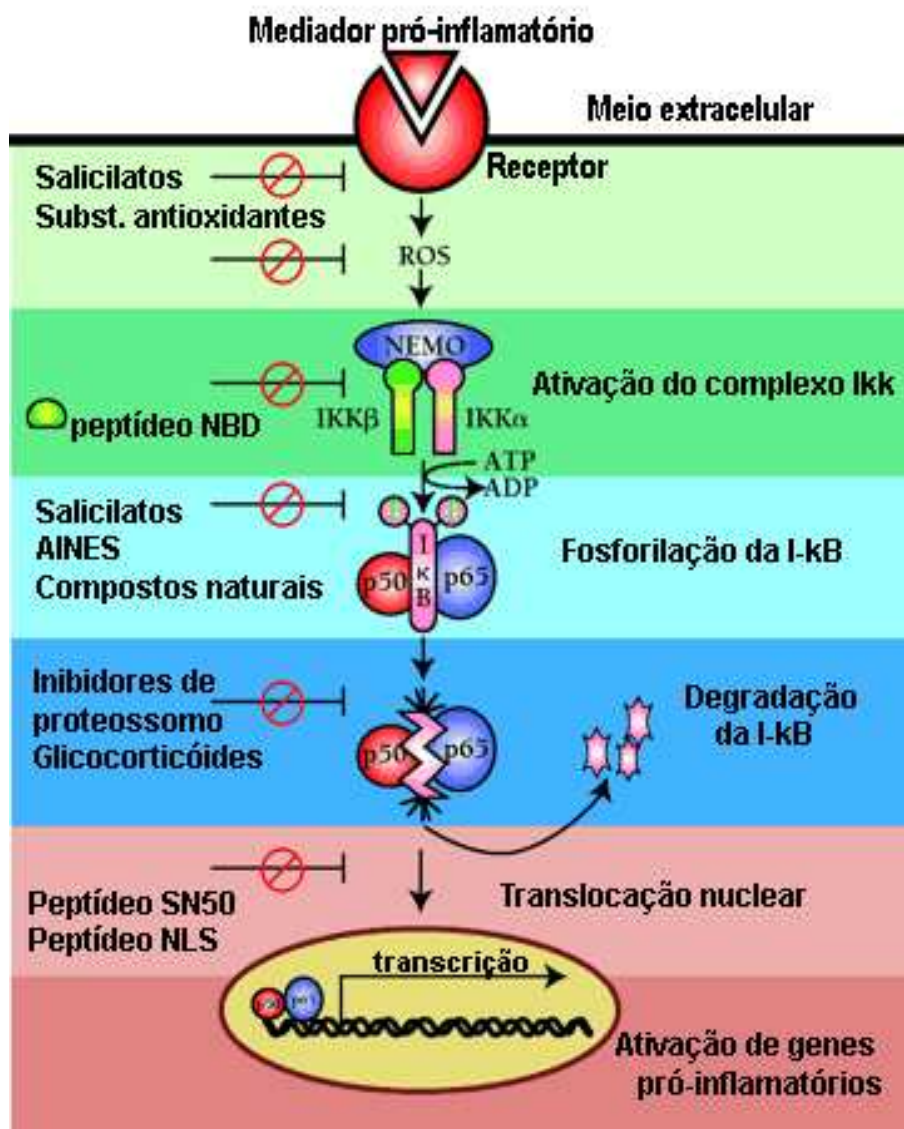


Figura 4- Inativação farmacológica das vias de ativação do NF-κB. (modificado de D'Acquisto et al., 2002).

A gliotoxina despertou o interesse de vários grupos de pesquisa devido a sua potente ação de inibição da atividade do NF- κ B. Esta toxina é um metabólito de pipolitiodioxopiperazina fúngica de propriedades imunossupressora e antiinflamatória (Fitzpatrick et al., 2002). Este efeito inibitório é devido ao fato também de inibir a proliferação celular, mostrando ser uma substância potencialmente antineoplásica, já que o fator de transcrição nuclear da família NF- κ B está implicado na ativação de genes associados à proliferação celular, angiogênese, metástase e supressão da apoptose (Shehata, 2005).

A inibição do NF- κ B também pode ser concebida por meio de técnicas de recombinação de DNA, como é caso da linhagem leucêmica de células monocíticas U937, transformadas com um vetor plasmidial contendo um promotor de citomegalovirus (pMCV) recombinando com um inserto do gene de I κ B contendo duas mutações nos sítios responsáveis por codificar os resíduos de serina das posições 32 e 36 da I κ B, as quais foram trocadas por alaninas, prevenindo a atividade catalítica das cinases IKK α ou IKK β sobre a I κ B, afetando assim a atividade do NF- κ B por não ser translocado para o compartimento nuclear (Asin et al., 1999; Pennington et al., 2001).

1.4- Displasia ectodérmica

Os distúrbios de ativação do NF- κ B podem produzir uma diversidade de doenças. Dentre elas, uma série de imunodeficiências isoladas ou acompanhadas de outras doenças devido ao eixo comum de sinalização do NF- κ B que apresenta um papel importante no processo de homeostase da epiderme e no desenvolvimento de anexos cutâneos (Orange et al., 2004).

A displasia ectodérmica (DE) é uma condição clínica heterogênea caracterizada por desenvolvimento anormal de estruturas derivadas do ectoderma, como dentes, cabelos, nariz e glândulas exócrinas. A literatura até o momento descreveu mais de 170 formas fenotípicas desta doença. A forma anidrótica/hipodrótica (DAE/HD) é caracterizada pela

presença de cabelos esparsos, anormalidades dentárias, pouca sudorese e episódios de hipertermia. (Smahi et al., 2002).

A displasia ectodérmica pode ser transmitida por herança recessiva ligada ao cromossomo X, autossômica dominante e autossômica recessiva (Murdoch-Kinch et al., 1993) e mutações espontâneas podem também ser as responsáveis pelo aparecimento da doença (Smahi et al., 2002), ou ainda por mutações hipomórficas (Pedersen e Hallett, 1994).

A forma recessiva ligada ao cromossomo X é a mais comum, sendo causada por uma mutação no gene ectodisplasina, um membro da família do TNF. A forma autossômica é causada por uma mutação no gene EDA3 (cromossomo 2q13) que codifica EDAR (“Ectodysplasin A Receptor”), uma proteína associada à família de receptores do TNF, cujo gene é responsável tanto pela forma dominante quanto a recessiva de DAE/HD. Em camundongos, este defeito leva a um defeito na subunidade α do complexo IKK (Mercúrio et al., 1997), resultando camundongos com inúmeros defeitos cutâneos como visto na DE e incapacidade de ativação do NF- κ B por células da pele (Doffinger et al., 2001). Outras mutações que podem levar a este comportamento fisiopatológico, como é o caso da alteração do gene da família de receptores que ligam ao TNF, localizado no cromossomo 1q42 que foi descrito em outra forma recessiva de DAE/HD, relatado por Yan et al., 2000. Os mesmos autores discutem que durante a ligação de EDA com seu respectivo receptor (EDAR) é ativado outra molécula intracelular como EDARADD (“EDAR-associated death domain”), que funciona como um adaptador para a ligação intracelular que confere a sinalização do complexo e ativação de NF- κ B e estudos bioquímicos desta molécula apresentam atividade NEMO dependente.

1.4.1- Displasia ectodérmica anidrótica com Imunodeficiência

Existe um subgrupo de DAE que apresenta imunodeficiência (DAE-ID), cujo histórico clínico é bastante variável, incluindo tanto defeitos celulares quanto moleculares. (Smahi et al., 2002).

A literatura descreve um pequeno número de pacientes com DAE acompanhados de infecção grave por bactérias piogênicas como *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e micobactérias, além de deficiência na produção de anticorpos anti-polissacarídeos. Habitualmente, os indivíduos do sexo masculino com DAE-ID apresentam infecção de repetição do trato superior respiratório, pele, tecidos moles, ossos, trato gastrointestinal e eventualmente septicemia ou meningite. Deve-se lembrar que a ativação de NF- κ B dependente de NEMO é uma importante via de sinalização associada com “Toll like receptors” (TLR), fenômeno visto em pacientes que apresentam baixa resposta inflamatória acompanhada de produção deficiente de citocinas como IL-1 β , IL-18 e TNF- α (Liou et al., 1995). Outros pacientes podem apresentar defeitos associados com baixa estimulação mediada por TNF- α , LPS e IL-1 (Yang et al., 2004; Vinolo et al., 2006). Uma das formas de ativação de NF- κ B e que está associada com NEMO seria através do reconhecimento de NEMO de Lys 63-ligada poliubiquinada com elementos de sinalização via complexo TNF-R1, cujo reconhecimento é requerido para que TNF- α induza o recrutamento de IKK para TNF-R1 e subsequente sinalização (Wu et al., 2006).

Inúmeros pacientes apresentam hipogamaglobulinemia com baixos níveis séricos de IgG ou IgG2, acompanhado de níveis variados de outros isótipos (IgA, IgM, IgE), embora outros tenham sido descritos como apresentando aumento dos níveis de IgM, sugerindo que alguns sinais mediados por CD40 são dependentes de NEMO para linfócitos B. Em alguns destes pacientes, existe uma incapacidade de resposta para a sinalização CD40-CD40L, enquanto que outros apresentam uma mudança de isótipo de cadeia pesada de imunoglobulina normal, porém com resposta linfoproliferativa prejudicada (Orange et al., 2004). Além da resposta deficitária de ativação de linfócitos B mediante CD40e defeitos na troca de isótipo de cadeia pesada de imunoglobulinas, existe prejuízo na atividade citotóxica de células NK da resposta mediada por LPS e produção de TNF- α e IL-12 (Orange et al., 2002). Estes defeitos levam a uma susceptibilidade específica para algumas infecções como, por exemplo, micobactérias atípicas (Abinun et al., 1996). Contudo uma das mais importantes manifestações laboratoriais nestes pacientes é a deficiência de anticorpos antipolissacarídeos, embora a resposta linfoproliferativa seja

normal quando comparada com outros tipos de imunodeficiências associadas com linfócitos B (Smahi et al., 2002).

Outros trabalhos mostram que mutações espontâneas podem também ser as responsáveis pelo aparecimento da doença (Pedersen e Hallett, 1994), que representam um grupo de defeitos naturais da via de sinalização do NF- κ B, causada por uma mutação hipermórfica no gene que codifica a proteína inibitória de NF- κ B, mais especificamente os nucleotídeos que codificam os resíduos de Serina 32 e Serina 36, impossibilitando a ação reguladora da atividade quinase do complexo NEMO/IKK, responsável pela fosforilação de I κ B e, conseqüentemente, bloqueando a migração do fator nuclear. (Döffinger et al., 2001; Courtois et al., 2003; Kim et al., 2003).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais:

Investigar o papel do NF- κ B na regulação do gene *CYBB* que codifica o componente gp91^{PHOX} do sistema NADPH oxidase humano em células mielocíticas U937 e células B imortalizadas de pacientes com DAE-ID e pacientes com DGC.

2.2- Objetivos específicos:

Investigar nas células mielocíticas da linhagem U937, U937 transformadas com vetor pCMV3 vazio e U937 com vetor contendo mutações I- κ B-S32I/S36, pré-diferenciadas ou não com IFN- γ e TNF- α e tratadas ou não com Dexametasona ou Gliotoxina e nas células B imortalizadas de pacientes portadores de DAE-ID e DGC, os seguintes parâmetros:

- Liberação de ânion superóxido;
- Expressão em tempo real do gene *CYBB* que codifica o componente gp91^{PHOX};
- Presença de NF- κ B no compartimento nuclear através do ensaio de retardo da mobilidade eletroforética de super complexo (EMSA supershift).

3- JUSTIFICATIVA

Os estudos em células da linhagem mielocítica THP-1 sob o tratamento com Dexametasona mostraram que este glicocorticóide é capaz de inibir a atividade do sistema NADPH oxidase. Este fato associado à descoberta da região consenso para NF- κ B, a -15 Kb de distância da região promotora do gene *CYBB*, partindo das diversas evidências na literatura que os antiinflamatórios não esteroidais, assim como os esteróides são bloqueadores da ativação do NF- κ B, afetam a explosão respiratória celular, levaram à realização deste estudo que objetiva elucidar alguns dos mecanismos de controle endógeno promovidos pelo NF- κ B sobre a expressão do gene *CYBB*, assim como contribuir para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos reguladores da expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase de células da linhagem mielóide.

4- CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1- Seleção de pacientes, controles e obtenção de células.

4.1.1- Pacientes

Foram incluídos dois pacientes com defeitos na via do NF- κ B, previamente caracterizados no laboratório do Prof. Jean Laurent Casanova. Os linfócitos imortalizados destes pacientes foram disponibilizados e encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular – CIPED – UNICAMP, cujos defeitos moleculares estão indicados abaixo. (Cortois et al., 2003; Doffinger et al., 2000; Picard e Casanova, 2005):

Molécula afetada	Herança	Mutação
NEMO	Lig X (hipomórfica)	X420W
I κ Ba	Aut Dom (hipermórfica)	S32I

Para análise comparativa, foi incluído um caso de doença granulomatosa crônica com quadro clínico previamente caracterizado por uma substituição de A>G na posição -2 da seqüência consenso do sítio doador e aceitor de splice do íntron 9 provocando a eliminação do éxon 10 no gene *CYBB*, afetando o processo de transcrição do RNA mensageiro e conseqüentemente a falta do componente gp91^{PHOX}, prejudicando a explosão respiratória, com mutação ligada ao X (X91°) (Prando-Andrade et al., 2004; Agudelo-Florez et al., 2006).

Também foram selecionados voluntários adultos sadios para análise comparativa. Os voluntários autorizaram previamente a utilização de amostras de seu sangue para propósitos científicos. Todos os procedimentos aqui descritos não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo de acordo com a regulamentação da convenção de Helsinki para pesquisa com seres humanos e do Conselho Nacional de Saúde. Os pacientes ingressaram no estudo depois do aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP.

4.1.2- Obtenção de células do sangue periférico e transformação de células B com vírus de Epstein-Barr

Sangue periférico dos pacientes com defeitos na via do NF- κ B, pacientes com DGC ou DAE-IDI e voluntários sadios foi coletado em frascos de polipropileno estéreis contendo ACD. A seguir, o sangue coletado foi diluído volume/volume em RPMI (Gibco) estéril. Depois foi adicionado o gradiente de centrifugação Ficoll-Hypaque (Böyum, 1968), no mesmo volume. Após centrifugação a 400g por 30 minutos a 20°C, a interface contendo a camada de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi coletada e separada da camada de polimorfonucleares. As células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS) (NaCl 0,14 M; Na₂PO₄ 0,01 M; pH 7,2), e a seguir quantificadas, tendo a sua viabilidade verificada pela utilização de Trypan blue (Sigma Chemical Co.).

O sangue total foi fracionado por centrifugação em Ficoll-Hypaque (Boyum, 1968) e a fração de células mononucleares cultivadas com sobrenadantes da linhagem B95-8, produtora de EBV (Condino-Neto e Newburger, 1998), Dessa forma, foi obtida uma fonte constante de ácidos nucléicos das células dos pacientes para os estudos moleculares, evitando-se, com isto, repetidas coletas de sangue em pacientes. Além disso, linfócitos B EBV mimetizam com eficiência a ativação da NADPH oxidase humana, bem como a expressão dos genes que codificam os componentes deste sistema.

4.1.3- Cultivo e tratamento das células da linhagem B transformadas pelo vírus de Epstein-Barr

Linfócitos B de sangue periférico imortalizados com vírus Epstein-Barr (EBV), foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO₂. A viabilidade celular foi monitorizada diariamente e a cultura mantida indefinidamente durante os estudos. Alíquotas das linhagens celulares foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido para estudos posteriores. Estas células foram tratadas com interferon-gama (IFN- γ ; 100 U/mL) e fator de

necrose tumoral alfa (TNF- α ; 1000 U/mL) por 48 horas e após essa incubação foram realizados protocolos experimentais analíticos.

4.2- Obtenção de células da linhagem U937

Células da linhagem monocítica de linfoma histiocítico difuso humano (U937), obtidas da ATCC; Rockville, MD, E.U.A., foram transformadas com um vetor plasmidial pMCV3 controle (U937pMCV3) ou contendo um inserto do gene de I κ B mutado que expressa a proteína inibitória com resíduos de serina nas posições 32 e 36 mutados por alaninas (U937pMCV3-I κ BM), gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Carlos V. Paya. (Asin et al., 1999; Pennington et al.; 2001).

4.2.1- Cultivo e tratamento das células da linhagem U937

Estas células foram cultivadas em frascos de cultura celular (50 ou 75 mL), de poliestireno contendo meio RPMI 1640 completo, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor, 2mM de L-glutamina, 100U/mL de estreptomicina, a 37°C, em atmosfera úmida, saturada com 5% de CO₂, em condições livres de endotoxina (<10pg/mL). A viabilidade celular foi monitorizada no dia do experimento.

O protocolo experimental foi estabelecido da seguinte forma: As células da linhagem U937 foram tratadas com Dexametosona na concentração de final de 1 μ M (Condino-Neto et al., 1998), ou Glitoxina 10 μ M (Yoshida et al., 2000), por 24 horas. Após esse período, foram incubadas com interferon-gama (IFN- γ ; 100 U/mL) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; 1000 U/mL) por mais 48 horas, perfazendo um total de 72 horas de incubação. O uso destas duas entidades farmacológicas de diferentes classes teve por objetivo bloquear a atividade do NF- κ B (D'Acquisto et al., 2002), em concentrações menores aos valores da IC₅₀ dos respectivos inibidores. Para um controle positivo dos ensaios realizados com as células U937, foi realizado somente o tratamento das células U937 com as citocinas por 48 horas.

4.3- Dosagem de Ânion Superóxido

A análise funcional do sistema NADPH oxidase foi realizada a partir da liberação de superóxido quantificada espectrofotometricamente utilizando o ensaio da redução do citocromo c, especificamente, inibido pela superóxido dismutase (SOD) (McCord e Fridovich, 1969). O ativador solúvel da proteína quinase c (PKC), 4β-forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) foi utilizado como agonista do sistema NADPH oxidase nos experimentos que quantificaram a liberação de superóxido. A atividade do superóxido foi determinada a partir da curva dose-resposta, com concentrações de PMA variando de 30, 100, 300, 1000 e 3000nM modificado por Condino-Neto et al., 1993; Condino-Neto et al., 1996.

As células U937 ou células B EBV-transformadas, cultivadas na presença ou ausência de Dexametosona ou Gliotoxina, foram incubadas em placas de cultura de seis poços com PMA na concentração 30 nM e citocromo c (80μM), na presença ou ausência de SOD (75 U/mL) a 37 °C, durante 60 minutos. Após a incubação, as placas foram colocadas em banho de gelo. O sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf e centrifugados a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C. A intensidade colorimétrica produzida pela reação de redução do citocromo c foi quantificada no comprimento de onda de 550 nm, (DU Series 500, Beckman). A quantidade total de superóxido liberado foi calculada aplicando-se o coeficiente de extinção de 21.100M⁻¹ cm⁻¹. Os resultados foram expressos em nmol de superóxido liberado por 10⁶ células por hora. (nmol O₂⁻ / 10⁶ células / hora).

4.4- PCR em tempo real

Para determinar os níveis de RNAm transcrito de gp91^{PHOX}, foi realizada a análise quantitativa de expressão em tempo real (Real Time PCR). Essa metodologia é baseada no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação de polimerização em cadeia (PCR) pela ligação de uma sonda específica (“Taqman, Molecular Beacon”) ou um corante (“SYBR Green”), na fita recém sintetizada. A detecção de amplificação em tempo

real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems), utilizando o reagente “SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems)”, contendo, dNTPs, MgCl₂, Tampão, Taq Ampli-Gold.

O RNA total das células U937 ou células B EBV-transformadas cultivadas na presença ou ausência de Dexametosona ou Gliotoxina, foi isolado de 10⁷ células. As células foram lavadas com Hank's 1X gelado e o RNA total foi extraído usando um reagente comercial TRIzol® (Gibco BRL, MD, USA; 1 ml / 1 x 10⁷ céls) e quantificado em espectrofotômetro (260/280 nm; DU 500, Beckman) e estocados a -80°C até seu uso. As amostras de cDNA foram sintetizadas a partir de 3 µg de RNA total usando o sistema de Transcrição Reversa com hexâmeros randômicos (5 µM; Amersham) em uma mistura de 20 µl contendo tampão RT (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM), dNTP's 250 µM cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen) 5 mM DTT (Invitrogen) 28,4 U de inibidor de RNase (RNAguard™; Amersham) e 200 U da enzima transcriptase reversa (M-MLV [Moloney Murine Leukemia Vírus] RT; kit Superscript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen) (Condino-Neto e Newburger, 2000).

Para PCR em tempo real foram usados num volume final de 25 µl os seguintes reagentes em concentrações finais: 5 ng/µl cDNA, 7.9875 µl Sybr® Green Master Mix (1X Sybr® Green Buffer, 3 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs, 0.63275 U Amplitaq Gold®, 0.25 U AmpErase® (UNG) e por fim 100µM de primers de *CYBB* e β-actina. Os oligonucleotídeos foram desenhados com o uso do software “Primer Express” (Applied Biosystems): para *CYBB*: sense, (5'-TTG TGG AAA CCC TCC TAT GA-3') e antisense, (5'-AAA ACC GCA CCA ACC TCT CA-3'), (Gene Bank NM 00397) e para β-actina: sense, (5'-TCA CCG AGC GCG GCT-3') e antisense, (5'-TAA TGT CAC GCA CGA TTT CCC-3'), (Gene Bank NM 001101).

A reação foi realizada na condição de 45 ciclos de anelamento, extensão e amplificação (95°C - 15 seg. e 60°C - 1 min.). Após a amplificação foi gerada uma curva de dissociação em (60°C a 95°C) de *CYBB* e β-actina, como controle interno. A quantificação da expressão do gene *CYBB* foi realizada em relação ao controle endógeno de expressão da β-actina. A análise relativa dos dados foi expressa pela derivação da formula aritmética

$2^{-\Delta\Delta CT}$, da qual são obtidos os níveis de expressão gênica das amostras em relação à expressão calibradora, conforme descrição do manual do equipamento.

4.5- Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética de supercomplexo (EMSA supershift)

Este ensaio é baseado na ligação de proteínas nucleares em sítios específicos de DNA nuclear, detectado por meio da migração eletroforética de complexos proteína-DNA-anticorpo, utilizando gel de poliacrilamida não desnaturado.

O protocolo de obtenção do extrato nuclear foi realizado de acordo com a descrição de Dignam et al., (1983) e Lee et al., (1988). As células da linhagem U937 ou células B EBV-transformadas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) gelado e a seguir centrifugadas a 240 x g a 4°C por 5 minutos. Após a lavagem foram ressuspensas em 10 mL de uma solução tampão A contendo 10 mM HEPES pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 500 nM Sacarose. Após esta lavagem, as células foram mais uma vez ressuspensas em 10 mL da mesma solução, adicionada de 0,2% Np-40 e 1 mL/ 10⁷ cels/mL de coquetel de inibidores de protease (Sigma®). Esta suspensão foi incubada em banho de gelo por 10 minutos com agitação ocasional para permitir a lise das membranas celulares. Logo após a ruptura citoplasmática, as estruturas nucleares foram separadas por centrifugação (400 x g a 4 °C por 5 minutos) e ressuspensas em 1 mL da mesma solução tampão B (50 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 8.0, 25 % glicerol, 0.1 mM EDTA e 1 mL/ 10⁷ cels/mL de coquetel de inibidores de protease (Sigma®). Após a centrifugação, as proteínas nucleares foram extraídas em mais uma solução tampão C composta de (350 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 8.0, 25 % glicerol e 0.1 mM EDTA). Esta extração permaneceu em banho de ultra-som por 30 minutos. Por fim, os extratos protéicos nucleares foram aliquotados e armazenados a -80°C. A concentração destas proteínas foi quantificada pelo método colorimétrico de Bradford e dosadas por espectroscopia no comprimento de onda de 595 nm. A dosagem da reação foi calibrada usando uma curva de concentração de Albumina do Soro Bovino (BSA).

Para a marcação oligonucleotídica, foram utilizados 4 pmol de oligonucleotídeos correspondentes a seqüências consenso para NFκB obtida pela Promega, Madison, WI (5'...AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C...3'), seqüência consenso para NFκB 5' distante da região promotora do gene do *CYBB* (5'... CGA TAA GGG GCT TTC CTG TTC A... 3') e seqüências consenso para NFκB mutada, também obtida pela Promega, Madison, WI (5'... AGT TGA GGC GAC TTT CCC AGG C...3'), com 0,5 ng de γ -³²P[ATP] 5'. A reação foi catalisada pela T4 polinucleotídeoquinase por 1 hora a 37 °C. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 5%, acrilamida 29% e bis-acrilamida a 1% na ausência de SDS, com dimensões 14 x 14 x 0,1 cm, moldado entre placas de vidro limpas. A reação de ligação foi feita em 4μl de “Binding Buffer”, contendo 10μg de proteína nuclear, 0,1nmol/ μl oligos P³² purificados, 1μg/mL de Poli (dIdC) (competidor por proteína que se ligam ao DNA inespecificamente, deixando a sonda radioativa livre para a ligação com o NFκB) e 4 μg anti-p50 (obtido pela Santa Cruz Biotechnology). Essa reação foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. A mobilidade eletrolítica ocorreu em tampão 0,5 x T.B.E. por 2 horas em 120 a 130 volts.

Após a corrida, o gel foi removido do suporte e aderido a uma folha de papel Whatman 3 MM, coberto com folha de plástico e seco a vácuo a 80°C por 1 hora. Logo após a secagem o gel foi exposto a -80°C a um filme Phosphoimager-BAS por cerca de 24 a 48 horas e os sinais de ligação do supercomplexo (NF-κB/ p50/ anti-p50) com as respectivas seqüências consenso NF-κB 5' *CYBB* e oligonucleotídeo consenso para NF-κB (Promega[®]), foram detectados pelo aparelho Phosphoimager, (Fujifilm, Phosphoimager BAS-1500).

4.6- Análise Estatística

Os dados foram representados como a média ± erro padrão da média (SEM). O teste de Mann-Whitney foi usado para a comparação entre os grupos e um valor de p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5- RESULTADOS

5.1- Efeitos da Dexametasona e Gliotoxina sobre o sistema NADPH oxidase em células da linhagem monocítica U937:

A liberação de superóxido por células U937 mostrou déficit importante quando tratadas com Dexametasona ou Gliotoxina e diferenciadas com as citocinas citadas anteriormente, quando comparado às células somente diferenciadas com IFN- γ e TNF- α , e as células U937pMCV3, sob as mesmas condições de tratamento e diferenciação, apresentaram também uma redução de ânion superóxido, mostrando que a transformação com vetor pMCV3 não altera a atividade fisiológica da oxidase. Já os resultados observados com as células transformadas com vetor pMCV3-I κ BM (contendo as mutações S32 e S32), apresentaram uma drástica diminuição da liberação de superóxido por todas as células diferenciadas e expostas à Dexametasona ou Gliotoxina. Estes resultados estão apresentados nos gráficos 1A, 1B e 1C.

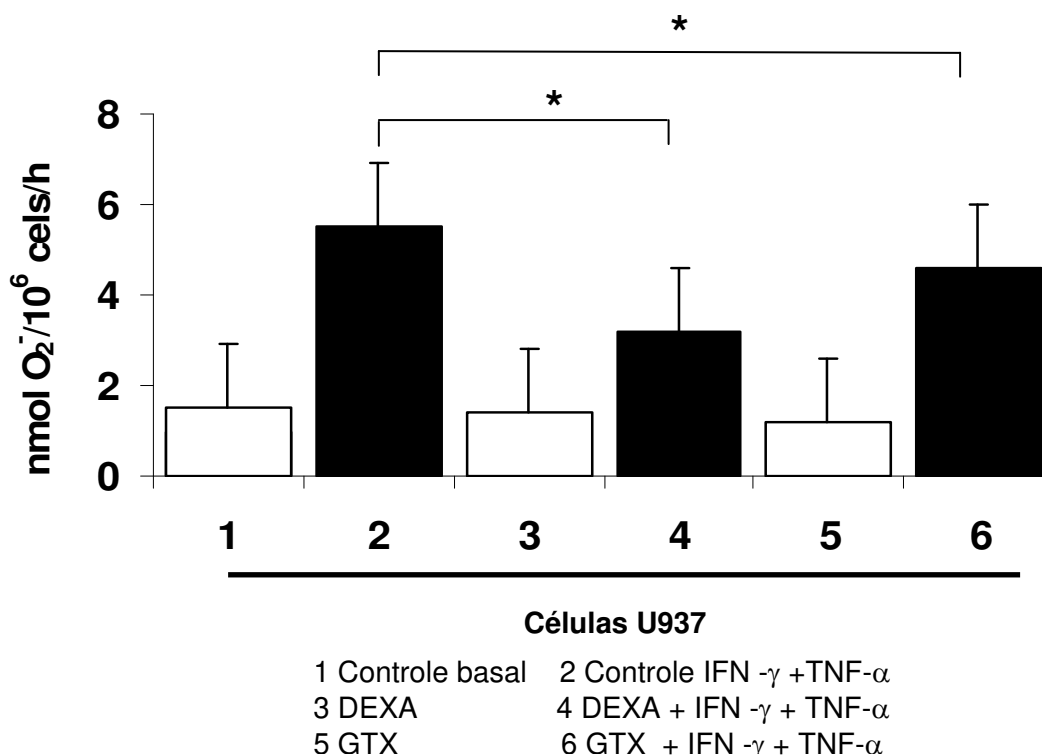


Gráfico 1A- Liberação de ânion superóxido por células U937. (*p< 0.05 comparado com as células diferenciadas; n= 6, teste de Mann-Whitney).

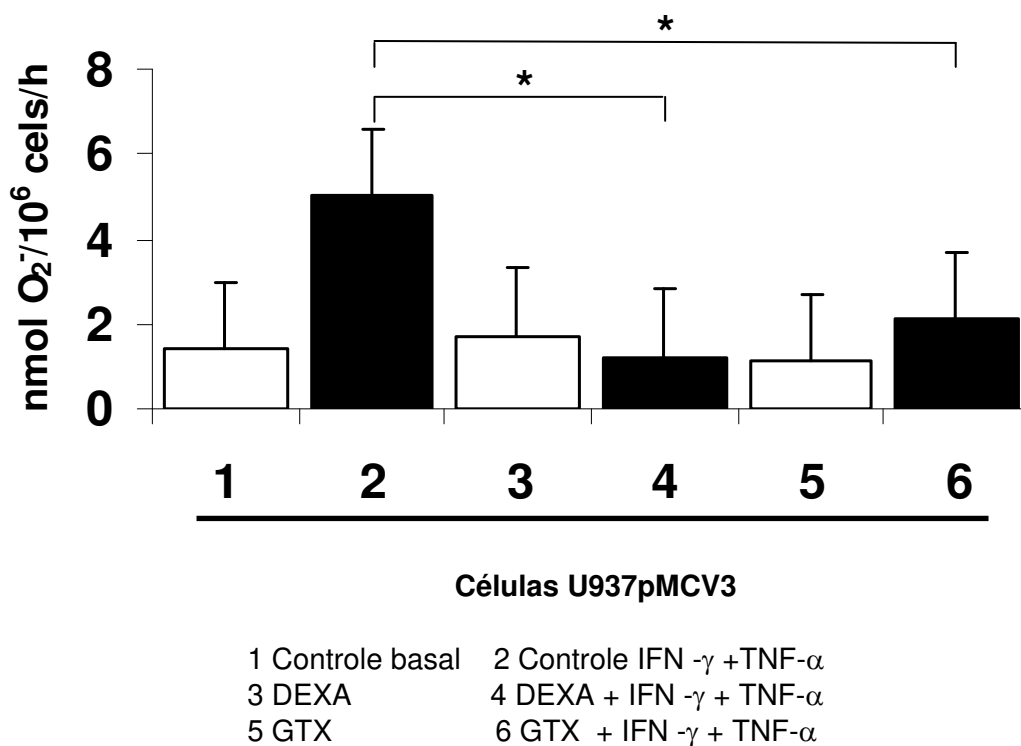


Gráfico 1B- Liberação de ânion superóxido por células U937pMCV3. (*p< 0.05 comparado com as células diferenciadas; n= 6, teste de Mann-Whitney).

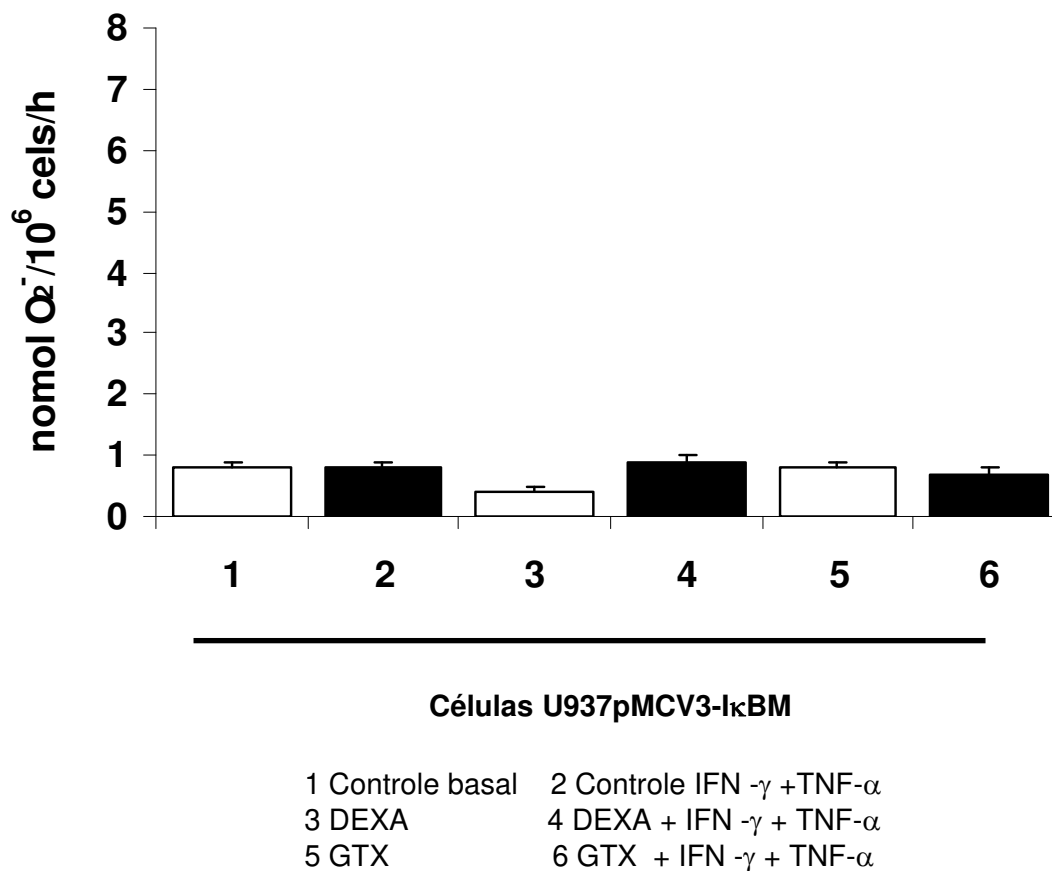


Gráfico 1C- Liberação de ânion superóxido por células U937pMCV3-IκBM. (*p< 0.05 comparado com as células diferenciadas; n= 6, teste de Mann-Whitney).

5.2- Efeitos das mutações naturais da via do NF-κB sobre a produção de ânion superóxido em células B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica e Imunodeficiência (DAE-ID):

Ao verificar os mesmos parâmetros em linfócitos B de pacientes portadores de Displasia Anidrótica Ectodérmica (EBV-DAE-IDκB S32I e DAE-ID NEMO/IKKγ X420W), observou-se uma baixa produção de superóxido, reproduzindo o fenômeno que é observado em células de pacientes portadores de Doença Granulomatosa Crônica (EBV-DGC), quando comparado às células linfocíticas normais de sangue periférico. Estes resultados estão apresentados no gráfico 2.

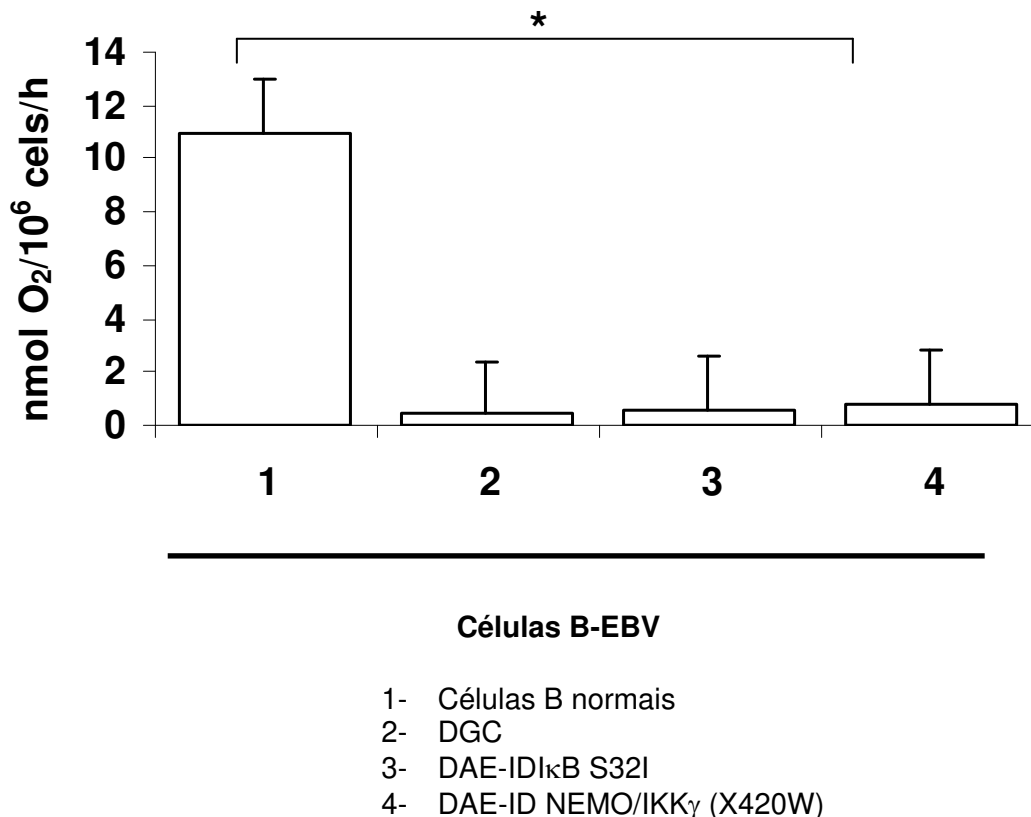


Gráfico 2- Liberação de ânion superóxido por células B-EBV de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC), com mutação ligada ao X (X91°) comparados com linfócitos B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica com Imunodeficiência (EBV-DAE-IDκB S32I e DAE-ID/ NEMO/IKK_γ X420W) . (*p <0.05 em todas as situações; n = 6, teste de Mann-Whitney).

5.3- Efeito da inibição do NF-κB sobre a expressão em tempo real do gene *CYBB* em células U937:

A expressão do gene *CYBB* avaliada por meio de PCR Quantitativo em Tempo Real, das células U937 mostraram uma redução significativa dos níveis de expressão do gene *CYBB*, quando comparado às células em condições basais controle que foram somente diferenciadas. No entanto, a redução da expressão produzida pela Gliotoxina foi bem mais intensa que a observada pelo tratamento com Dexametosona. As células U937

transformadas com um vetor plasmidial pMCV3 controle (U937pMCV3) também apresentaram uma redução significativa dos níveis de expressão do gene *CYBB*, quando comparado às células em condições basais controle que foram somente diferenciadas. Mais uma vez, foi constatada uma maior atividade inibitória produzida pela Gliotoxina, que induziu uma redução mais intensa, nos níveis de expressão do gene *CYBB*, comparando com a do tratamento com Dexametosona. As células U937pMCV3-I κ BM (contendo as mutações S32 e S32) apresentaram uma drástica redução da expressão do gene *CYBB*, independente do tratamento farmacológico, quando comparado às células controle que foram somente diferenciadas. A normalização da quantificação da expressão do gene *CYBB* foi realizada utilizando um controle endógeno de expressão da β -actina. Estes resultados estão apresentados nos gráficos 3A, 3B e 3C.

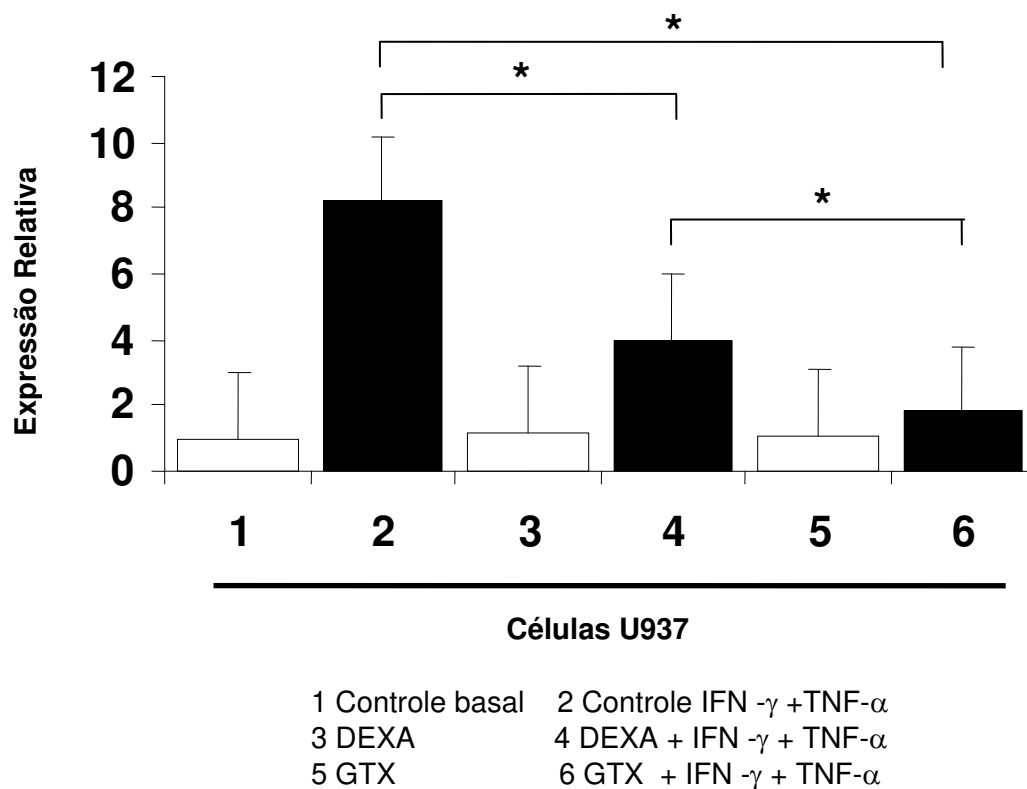
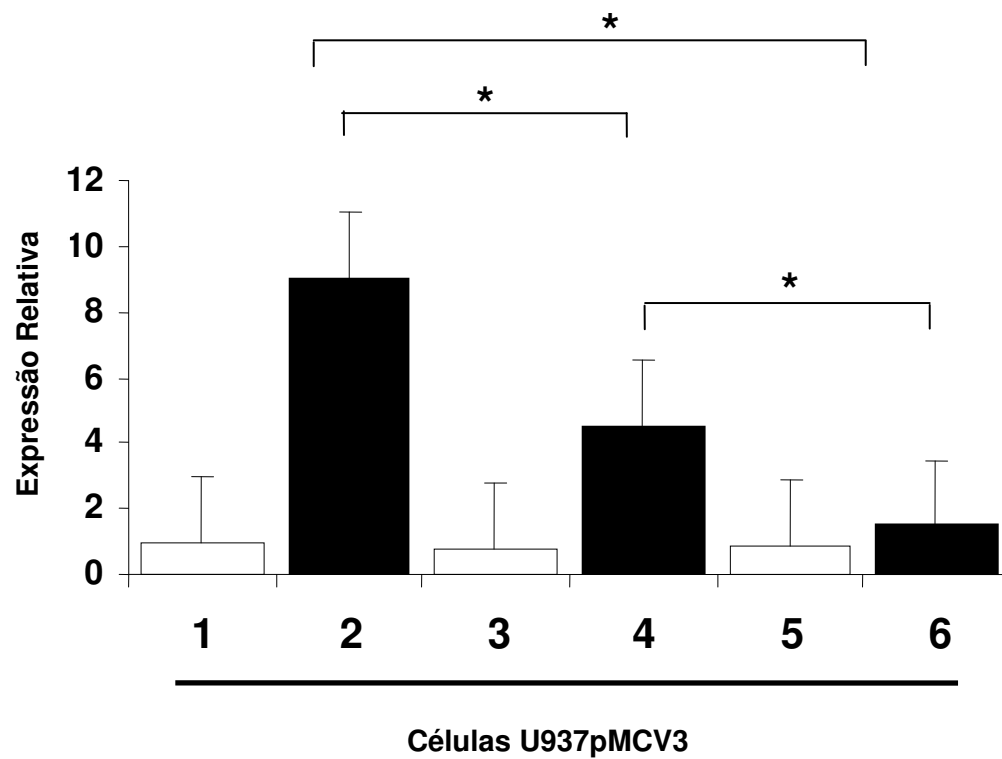
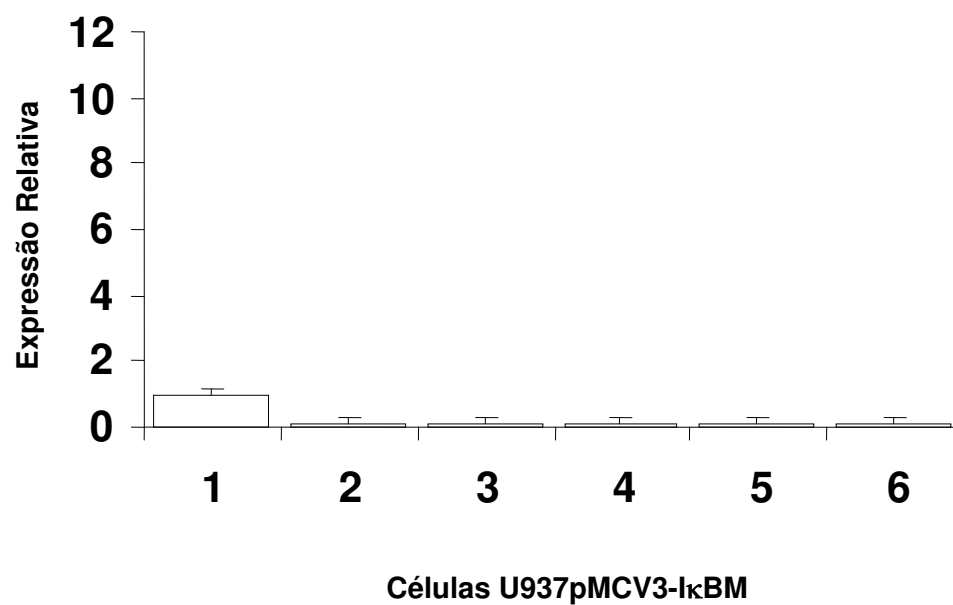


Gráfico 3A- Expressão relativa do gene *CYBB* (PCR em tempo real) por células U937.
 (*p <0.05 em todas as situações; n = 6, teste de Mann-Whitney).



1 Controle basal 2 Controle IFN γ + TNF- α
 3 DEXA 4 DEXA + IFN γ + TNF- α
 5 GTX 6 GTX + IFN γ + TNF- α

Gráfico 3B- Expressão relativa do gene *CYBB* (PCR em tempo real) por células U937pMCV3. (*p <0.05 em todas as situações; n = 6, teste de Mann-Whitney).



1 Controle basal 2 Controle IFN γ + TNF- α
 3 DEXA 4 DEXA + IFN γ + TNF- α
 5 GTX 6 GTX + IFN γ + TNF- α

Gráfico 3C- Expressão relativa do gene *CYBB* (PCR em tempo real) por células U937pMCV3-I κ BM. (*p <0.05 em todas as situações; n = 6, teste de Mann-Whitney).

5.4- Efeitos das mutações naturais Ikb 32s/36s sobre a expressão do gene *CYBB* em células B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica com imunodeficiência (DAE-ID):

A expressão do gene *CYBB* pelos linfócitos B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica com imunodeficiência (EBV-DAE-ID κ B S32I e DAE-ID NEMO/IKK γ X420W) foi significativamente reduzida, reproduzindo o que é observado em células de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (EBV-DGC), quando comparado às células de indivíduos sadios. Estes resultados estão apresentados no gráfico 4.

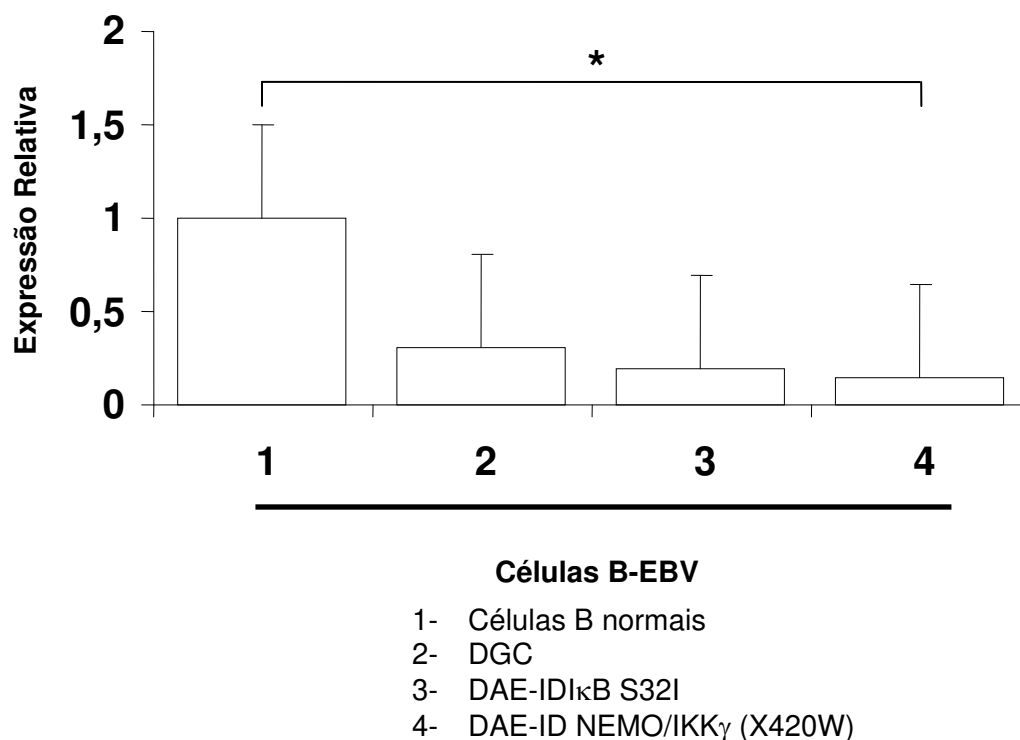


Gráfico 4- Expressão relativa do gene *CYBB* (PCR em tempo real) por células B-EBV de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC), com mutação ligada ao X (X91°), comparada a células B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica com Imunodeficiência (EBV-DAE-ID κ B S32I e DAE-ID/ NEMO/IKK γ X420W). (*p <0.05 em todas as situações; n = 6, teste de Mann-Whitney).

5.5- Determinação da presença de NF- κ B no compartimento nuclear de células U937 tratadas com Dexametasona ou Gliotoxina:

Na investigação de translocação do fator nuclear kappa B para compartimento nuclear de células da linhagem U937 selvagem, U937 pMCV3 ou U937pMCV3-I κ BM, submetidas aos mesmos tratamentos anteriores, observou-se uma diminuição significativa da ligação do supercomplexo (NF-I κ B/ p50/ anti-p50) com as seqüências consenso de NF- κ B 5' flanqueadora do gene do *CYBB* e de oligonucleotídeos consenso de NF- κ B (Promega®), nas células U937 e nas células U937pMCV3. No entanto, os resultados observados com as células U937 contendo o vetor pMCV3-I κ BM com as mutações S32 e S32 apresentaram ausência total da ligação do supercomplexo com os respectivos oligonucleotídeos consenso. Para detectar os possíveis eventos de ligações inespecíficas, foram realizados ensaios de competição com sondas de seqüências mutadas marcadas com radioisótopo. A identidade do heterodímero foi confirmada através da presença do anticorpo anti-p50 no supercomplexo de ligação. Os resultados estão ilustrados no gráfico 5.

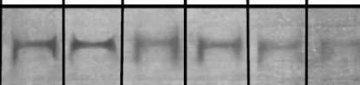
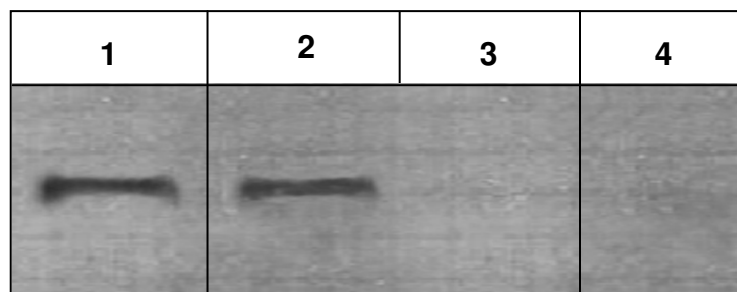
-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	IFN- γ , TNF- α
-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	DEXA
-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	GTX
																		
U937						U937 pMCV3						U937 I κ B-S32A/S36A						

Gráfico 5- Ensaio eletroforético da mobilidade de super complexo (EMSA supershift) do heterodímero NF- κ B com seqüências consenso NF κ B da região transcritora do gene do *CYBB* (5'... CGA TAA GGG GCT TTC CTG TTC A... 3'), em células monocíticas humanas U937, U937pMCV3 ou U937pMCV3-I κ BM. (Representativamente comparado com as células diferenciadas, n= 6, teste de Mann-Whitney).

5.6- Migração do NF- κ B no compartimento nuclear de células B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica com Imunodeficiência (DAE-ID):

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados no gráfico 6. Pode-se observar a ausência da ligação do supercomplexo (NF- κ B/ p50/ anti-p50) com as seqüências consenso de NF- κ B 5' flanqueadora do gene do *CYBB*, nas células B-EBV de pacientes com Displasia Anidrótica Ectodérmica com imunodeficiência (DAE-ID κ B S32I e DAE-ID NEMO/IKK γ X420W). Entretanto, quando se compara este resultado com os outros resultados obtidos em células de pacientes portadores de Doença Granulomatosa Crônica (EBV-DGC) e células linfocíticas normais de sangue periférico, este mesmo fenômeno não ocorre. Indicando a presença do fator protéico dentro do invólucro nuclear. Para discriminar os possíveis eventos de ligações inespecíficas foram realizados ensaios de competição com sondas de seqüências consenso. A identidade do heterodímero foi confirmada através da presença do anticorpo anti-p50 no supercomplexo de ligação.



- 1- Células B normais
- 2- Células B-EBV de DGC
- 3- Células B-EBV de DAE-ID κ B S32I,
- 4- Células B-EBV de DAE-ID NEMO/IKK γ (X420W)

Gráfico 6- Ensaio eletroforético da mobilidade de supercomplexo (EMSA supershift) de NF- κ B com seqüências consenso de ligação específica. (Representativamente comparado com as células diferenciadas, n= 6, teste de Mann-Whitney).

6- DISCUSSÃO

Condino-Neto et al., (1998) demonstraram que células da linhagem mielocítica THP-1 diferenciadas com IFN- γ e TNF- α e tratadas com glicocorticóides, especificamente Dexametasona e estimuladas com acetado de forbol miristato (PMA), apresentavam uma diminuição na liberação de ânion superóxido e queda dos níveis transcrição do gene *CYBB*. Somam-se a esses resultados as evidências de que o gene *CYBB* possui uma seqüência consenso de ligação para NF- κ B à -15kb de distância da região promotora na direção “upstream”, como demonstra um estudo atual de footprinting com DNase I realizado por (Thain, et al., 2008 submetido e em revisão - Journal of Biological Chemistry. Em anexo).

Este trabalho investigou o papel do NF- κ B sobre a expressão do gene *CYBB* por células da linhagem monocítica U937 tratadas com Dexametasona ou Gliotoxina e posteriormente diferenciadas com IFN- γ e TNF- α . Estes experimentos mostraram que estes inibidores produzem uma diminuição da expressão do gene *CYBB*, acompanhada de uma baixa produção de ânion superóxido e diminuição de translocação do NF- κ B para o compartimento nuclear. Ao comparar os efeitos produzidos pelos dois agentes farmacológicos em questão, observa-se que a Gliotoxina produz uma redução mais acentuada destes parâmetros em comparação com o efeito produzido pela Dexametasona.

A inibição da atividade NADPH oxidase e da expressão do componente gp91^{PHOX} promovido pela ação farmacológica do glicocorticóide está associado com a habilidade destas moléculas interromperem as vias de ativação do NF- κ B (Auphan et al., 1995; Ito et al., 2006), promovendo a retenção deste fator de transcrição no citoplasma ou desativação deste fator de várias maneiras como a ativação da transcrição de I- κ B (Ponta et al., 1992) bloqueando a translocação do NF- κ B para o compartimento nuclear ou produzindo uma interação com o receptor glicocorticóide (RG), o qual interage com o NF- κ B que se liga à subunidade p65 do heterodímero NF- κ B, impedindo a ligação DNA – NF- κ B (Adock et al., 1994) que, por sua vez, suprime a transcrição de genes controlados por este fator. Mecanismos adicionais também são citados por outros autores, como é caso da indução da desacetilação das histonas promovido pela ação de glicocorticóides produzindo conseqüentemente, a compactação de DNA, impedindo assim a ligação de NF- κ B em seus respectivos sítios de ligação (Ito et al., 2000; Ito et al., 2001),

No entanto, a Gliotoxina dispõe de um mecanismo distinto, devido à sua capacidade de inibir proteases. Sua presença no meio intracelular promove a inativação da via proteolítica mediada pela atividade do núcleo catalítico do complexo 20S do proteossomo dependente de ubiquitina e ATP (Kroll, et al., 1999), conseqüentemente promovendo um aumento da permanência do I κ B no meio citoplasmático (Moynagh, 2005; Nishida, 2005).

A diferença de magnitude de inibição vista pela Gliotoxina em relação à Dexametasona pode ser parcialmente explicada pelo fato de a Gliotoxina bloquear a migração deste fator para o núcleo, enquanto a Dexametasona permite que o NF- κ B seja translocado até o núcleo (D'Acquisto et al., 2002), possibilitando a ativação de mecanismos de compensação.

A hipótese de que a interação do NF- κ B é realmente necessária para a transcrição do gene *CYBB* torna-se mais evidente, quando os mesmos parâmetros são estudados no modelo de manipulação gênica, utilizando células monocíticas da linhagem U937 transformadas com um vetor plasmidial, recombinado com um inserto do gene de I κ B contendo duas mutações (32I 36I), (Asin, et al., 1999; Pennington, et al., 2001), também tratadas com os inibidores farmacológicos e, para uma análise de controle das condições fisiológicas da expressão gênica que possivelmente pudessem sofrer alterações, foram concomitantemente avaliados os mesmos parâmetros anteriores em células da linhagem U937 contendo o vetor vazio como um controle negativo da análise.

Os resultados destes novos experimentos mostraram que as células transformadas com o inserto do gene de I κ B (32I 36I) diminuíram drasticamente a expressão do gene *CYBB*, ocorrendo o mesmo com a explosão respiratória, comparado aos resultados observados com as células selvagens submetidas aos mesmos tratamentos. Interessantemente, os resultados vistos com o modelo celular de manipulação gênica demonstraram existir uma correlação concordante aos efeitos dos inibidores farmacológicos. Além disso, essas células também demonstraram ausência da formação do complexo NF- κ B/DNA, confirmado pelos resultados de ensaios de supershift, mostrando um bloqueio da translocação do NF- κ B para o compartimento nuclear.

Numa revisão mais apurada sobre o controle da expressão dos genes do sistema NADPH oxidase, a transcrição do gene *CYBB* é mediada por um conjunto de seqüências reguladoras cis atuantes e de fatores de transcrição tecido-específicos (Kautz et al., 2001), como por exemplo: elf-1 e PU.1 que são restritos à linhagem mielóide (Voo e Skalnik, 1999), sendo que a fosforilação de PU.1 aumenta a afinidade deste fator pela região promotora do gene *NCF-1* induzindo a diferenciação tecido-específica mielocítica (Marden, 2003). Outros fatores como IRF1, ICSBP e CBP dependentes de proteínas tirosina fosfatase (SHP1-PTP) ativam gp91^{PHOX}, p22^{PHOX} e p47^{PHOX} (Kautz et al., 2001) em células mielóides. Em eosinófilos, os fatores GATA-1 e 2 são necessários para ativar a expressão do gp91^{PHOX} (Yang et al., 2000). A interação das proteínas da família “Homeobox” (Hox) parece ser essencial para a regulação do gene *CYBB* e *NCF2* (Eklund et al., 2000) e outros trabalhos mostram uma grande relevância da presença de quatro cis-elementos para o fator transcricional YY1, presentes à -145 a -412 pb “upstream” da região promotora do gene *CYBB* (Jacobsen e Skalnik, 1999).

Os resultados deste estudo mostrados até esse ponto, são curiosamente coincidentes com os relatos publicados por Anrather et al., (2006), que demonstraram a falta da atividade NADPH oxidase em leucócitos, fibroblastos e microgliócitos de linhagem murina, submetidas a um bloqueio atividade do fator nuclear kappa B. Nesse mesmo trabalho os autores discutem a presença de possíveis elementos cis de ligação de NF-κB, na região promotora do gene *CYBB* de células murinas.

Ao estabelecer uma correlação entre o sistema NADPH oxidase e falta ou disfunção das diversas vias de ativação do NF-κB, pode-se observar que estes distúrbios moleculares são capazes produzir alterações no sistema imunológico com repercussões clínicas. Quando estas disfunções ocorrem isoladamente nos componentes do sistema NADPH oxidase, bloqueia-se a produção dos reativos intermediários do oxigênio, interferindo na capacidade microbicida das células leucocitárias. Essas alterações levam ao desenvolvimento da Doença Granulomatosa Crônica (DGC). Por outro lado, a deficiência de alguns dos componentes de sinalização da ativação do NF-κB, pode desencadear um grupo heterogêneo de imunodeficiências (Nishikomori et al., 2004), gerando a Displasia Anidrótica Ectodérmica com Imunodeficiência (DAE-ID), de caráter mendeliano recessivo,

ligado ao sexo, ou de forma autossômica dominante ou ainda, autossômica recessiva (Murdoch-Kinch et al., 1993). Recentes trabalhos na literatura vinculam os defeitos de sinalização das vias de ativação do NF- κ B às doenças Displasia Anidrótica Ectodérmica, associada ou não com imunodeficiência. (Döffinger et al., 2001; Courtois et al., 2003).

Neste sentido, este trabalho procurou avançar ainda mais o entendimento do papel do NF- κ B sobre a atividade do sistema NADPH oxidase através de um estudo comparativo da liberação de ânion superóxido e expressão do gene *CYBB* entre as células da linhagem U937 submetidas aos protocolos de inibição da atividade do NF- κ B, com células linfocíticas imortalizadas com vírus Epstein-Barr de pacientes portadores de DGC ou DAE-ID comparadas com células B-EBV de indivíduos normais.

As células de pacientes que foram utilizadas neste estudo mostram um padrão de herança autossômica dominante de Displasia Anidrótica Ectodérmica associada com Imunodeficiência causada por uma mutação (S32) no gene que expressa I κ B α , o que impossibilitaria a ação reguladora da atividade quinase do complexo NEMO/IKK, responsáveis pela fosforilação de I κ B, bloqueando a migração do NF- κ B, para o núcleo (Courtois et al., 2003). Semelhante à situação artificial das células U937 transformadas com o vetor contendo um inserto do gene de I κ B mutado (U937pMCV3-I κ BM) que concomitantemente reproduz o mesmo fenótipo alterado visto em células B-EBV de pacientes com DGC que apresentam defeitos moleculares nos genes relacionados ao sistema NADPH oxidase (Agudelo-Florez et al., 2006).

Os resultados obtidos nos experimentos realizados com linfócitos B-EBV de pacientes com DAE-ID evidenciaram um prejuízo na expressão do gene *CYBB* seguido da falta de explosão respiratória, semelhante aos resultados que apresentaram as células B-EBV de pacientes com DGC secundária à mutação no gene *CYBB* (Agudelo-Florez et al., 2006). Esse resultado explica em parte a suscetibilidade à infecção dos pacientes portadores de DAE-ID (Courtois et al., 2003), indicando que esta alteração também pode gerar outros distúrbios no compartimento mielóide destes pacientes. No entanto o NF- κ B estava presente no extrato nuclear das células de pacientes com DGC. Isso se dá por que as duas doenças não compartilham do mesmo mecanismo molecular fisiopatológico, já que a

alteração das células do portador de DGC ocorre intrinsecamente no gene que codifica o componente gp91^{PHOX}, comprometendo diretamente a atividade NADPH oxidase (Agudelo-Florez et al., 2006).

Por outro lado, a ausência de NF-κB no interior do núcleo das células de pacientes com DAE-ID, junto à falta de expressão do gene *CYBB* mostrada nestas células, confirma a hipótese que o NF-κB possui relevância no controle transcricional do gene *CYBB*, quando comparados os modelos de manipulação farmacológica/gênica a este modelo natural de “knock out” humano.

É interessante observar que a mutação (S32I S36I) pode provocar inúmeras deficiências celulares através de diversos genes que requerem o NF-κB, sendo que o efeito mais devastador desta deficiência compreenderia os componentes do sistema imunológico que não podem se desenvolver sem a presença do NF-κB. O efeito destas mutações sobre o controle de genes mediados por NF-κB de células mielocíticas humanas ainda não foi explorado e trata-se, portanto, de um campo fértil para o estudo da fisiopatologia molecular de diversas imunodeficiências primárias, que ainda permanecem sem entendimento, já que, conclusivamente, o NF-κB é um fator de transcrição freqüente e de grande importância para transcrição de genes da série mielocítica.

Diante do conjunto de todos estes resultados, pode-se sugerir que o fator nuclear kappa B promove um controle cooperativo para a transcrição do gene *CYBB*, sendo necessário para o desenvolvimento da atividade do sistema NADPH oxidase humano.

Em relação à DAE-ID, estes defeitos teriam ainda maior importância, pois além de provocar os distúrbios linfocitários como foi descrito por Courtois et al., (2003), estas alterações também podem gerar danos na função mielocítica, uma vez que o NF-κB é responsável pela ativação de um grande número de genes da série mielóide, reproduzindo o mesmo quadro bioquímico molecular visto em células de pacientes com DGC, conduzindo a imunodeficiências severas.

7- CONCLUSÃO

Conclui-se que o NF- κ B é necessário para a expressão do gene de *CYBB* e conseqüentemente importante para o desenvolvimento do sistema NADPH oxidase humano.

Defeitos na sinalização celular causadas por mutações que afetam a atividade do NF- κ B, como é o caso da Displasia Ectodérmica, pode conduzir a um fenótipo celular semelhante ao observado em pacientes com Doença Granulomatosa Crônica afetando não só o compartimento linfóide, como já é conhecido, mas também produzindo distúrbios mielóides, levando a uma imunodeficiência severa.

Portanto a continuidade de estudos mais detalhados sobre a atividade NADPH oxidase como agente bactericida em fagócitos primários de pacientes portadores de DAE-ID são necessários, correlacionando os diversos defeitos nas vias de ativação do NF- κ B, com suscetibilidade às infecções que acometem estes pacientes.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abinun M, Spickett G, Appleton AL, Flood T, Cant AJ. Anhidrotic ectodermal dysplasia associated with specific antibody deficiency. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 146-47.

Adock IM, Shirasaki H, Gelder CM, Peters MJ, Brown CR, Barnes PJ. The effects of glucocorticoids on phorbol ester and cytokine stimulated transcription factor activation in human lung. *Life Sci* 1994; 55: 1147-53.

Agudelo-Florez P, Prando-Andrade CC, Lopez JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FE, et al. Chronic granulomatous disease in Latin American Patients: Clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46: 243-45.

Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, et al. The large-conductance Ca^{2+} , activated K^{+} channel is essential for innate immunity. *Nature* 2004; 427: 853-58.

Almawi WY, Melemedjian OK. Negative regulation of nuclear factor- κB activation and function by glucocorticoids. *J Mol End* 2002; 28: 69-78.

Amann R, Peskar BA. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur J Pharmacol* 2002; 447: 1-9.

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

Asin S, Taylor JA, Trushin S, Bren G, Paya CV. I κB Mediates NF- κB Activation in Human Immunodeficiency Virus-Infected Cells. *Virol* 1999; 73: 3893-03.

Auphan N, Didonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κB activity through induction of I κB synthesis. *Science* 1995; 27: 286-90.

Babior BM. NADPH oxidase: an uptake. *Blood* 1999; 93: 1464-76.

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109: 33-44.

Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 42-47.

Baehner R, 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: 3398-40.

Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science* 1967; 155: 835-36.

Baeuerle PA, Baltimore D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 1988; 242: 540-46.

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

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

Bei L, Lu Y, Eklund EA. HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 2005; 280: 12359-70.

Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med* 1957; 40: 309-12.

Bessler H, Mendel C, Straussberg R, Gurary N, Aloni D, Sirota, L. Effects of dexamethasone on IL-1 β , IL-6, and TNF- α production by mononuclear cells of newborns and adults. *Biol Neonate* 1999; 75: 225-33.

Böyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97: 31-50.

Brenowitz M, Senear DF, Shea MA., Ackers GK. "Footprint" titrations yield valid thermodynamic isotherms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8462-66.

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.
- Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 2001; 99: 7-17.
- Carlsen HS, Moskaug JOL, Fromm SH, Blomhoff R. *In vivo* imaging of NF- κ B activity. *J Immunol* 2002; 168:1441-46.
- Chanock SI, El Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994; 269: 24519-22.
- Chen LF, Fihchle W, Werdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 2001; 293: 1653-57.
- Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest* 1990; 85: 714-21.
- Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 1999; 179: S309-17.
- Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 17: 8-14.
- Collado-Escobar D, Mollinedo F. Dexamethasone modifies the functional responses of the granulocytic differentiating HL-60 cells. *Biochem J* 1994; 299: 553-59.
- Condino-Neto A, Muscara MN, Grumach AS, Carneiro-Sampaio MM, Nucci G de. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol* 1993; **35**: 485-90.
- Condino-Neto A, Muscara MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandao AC, Grumach AS, et al. Effect of therapy with recombinant human interferon-gamma on the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16: 357-64.

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: 4960-67.

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

Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Döffinger R, Cancrini C, Bonnet M, et al. A hypermorphic I κ B α mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J. Clin. Invest* 2003; 112: 1108-15.

Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 1995; 154: 4719-25.

Crinelli R, Antonelli A, Bianchi M, Gentilini L, Scaramucci S, Magnani M, et al. Selective inhibition of NF- κ B activation and TNF- α production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 211-22.

D'Acquisto M, 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.

Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *Immunol Methods* 1999; 232: 3-14.

Deering RP, Orange JS. Development of a clinical assay to evaluate toll-like receptor function. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 68-76.

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.

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: 531-33.

Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 1475-89.

Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 1987; 327: 717-20.

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: 22-29.

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- κ B signaling. *Nat genet* 2001; 27: 277-85.

Doucas V, Shi Y, Miyamoto S, West A, Verma I, Evans RM. Cytoplasmic catalytic subunit of protein kinase A mediates cross-repression by NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 11893-98.

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 Factor1, 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: 6095-05.

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

El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53:199-06.

Fitzpatrick LR, Wang J, Le T. Gliotoxin, an inhibitor of nuclear factor-kappa B, attenuates peptidoglycan-polysaccharide-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8:159-67.

Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Johnston RB. Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. *Hematol /Oncol Clin N Am* 1988; 2: 253-66.

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

Galas DI, Schmitz A. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* 1978; 5: 3157-70.

Garcia-Piñeres AJ, Castro V, Mora G, Schmidt TJ, Strunck E, Pahl HL, et al. Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *Biol Chem* 2001; 276: 39713-20.

Garcia-Piñeres AI, Lindenmeyer MT, Merfort L. Role of cysteine residues of p65/NF-kappaB on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. *Life Sci* 2004; 75: 841-56.

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.

Gerritsen ME, Williams AI, 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.

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.

Hawkins SM, Kohwi-Shigematsu T, Skalnik DG. The matrix attachment region-binding protein SATB1 interacts with multiple elements within the gp91phox promoter and is down-regulated during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 2001; 276: 44472-80.

Henderson LM, Chappell JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1273: 87-07.

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

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

Heyworth PG, Cross A, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Current Opinion Immunol* 2003; 15: 578-84.

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

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

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.

Ito K, Barnes PI, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1B-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6891-03.

Ito K, Jazrawi E, Cosio B, Barnes PI, Adcock IM. p65 activated histone acetyltransferase activity is repressed by glucocorticoids: mifepristone fails to recruit HDAC2 to the p65-HAT complex. *J Biol Chem* 2001; 276: 30208-15.

Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 522-43.

Jacobsen BM, Skalnik DG. YY1 binds five cis-elements and trans-activates the myeloid cell-restricted gp91(phox) promoter. *J Biol Chem* 1999; 274: 29984-93.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-63.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 301-10.

Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3: 221-27.

Kautz B, Kakar R, David E, Eklund E.A. SHP1 protein-tyrosine phosphatase inhibits gp91PHOX and p67PHOX expression by inhibiting interaction of PU.1, IRF1, interferon consensus sequence-binding protein, and CREB-binding protein with homologous Cis elements in the CYBB and NCF2 genes. *J Biol Chem* 2001; 276: 37868-78.

Kim S, La Motte-Mohs RN, Rudolph D, Zúñiga-Pflücker JC, Mak TW. The role of nuclear factor- κ B essential modulator (NEMO) in B cell development and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1203-08.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620-50.

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

Kroll M, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, Thomas D, Friguet B, Concon IM. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chem Biol* 1999; 6: 689-98.

Lawrence T, Beben M. IKK α in the regulation of inflammation and adaptive immunity. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 270-72.

Lee J, Jung E, Lim J, Lee J, Hur S, Kim SS, et al. Involvement of nuclear factor- κ B in the inhibition of pro-inflammatory mediators by pinosylvin. *Planta Med* 2006; 72: 801-6.

Lee KA, Bindereif, A., Green, M.R. A small-scale procedure for preparation of nuclear extracts that support efficient transcription and pre-mRNA splicing. *Gene Anal Tech* 1988; 5: 22-3.

Leiva LE, Zelazco M, Oleastro M, Carneiro-Sampaio M, Condino-Neto A, Costa-Carvalho BT, et al. Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: The Second Report of the LAGID Registry. *J Clin Immunol* 2007; 27: 101-8.

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

Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 3-22.

lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 743-55.

Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 725-34.

Lindsey S, Huang W, Wang H, Horvath E, Zhu C, Eklund EA. Activation of SHP2 protein-tyrosine phosphatase increases HoxA10-induced repression of the genes encoding gp91(PHOX) and p67(PHOX). *J Biol Chem* 2007; 282: 2237-49.

Liou WC, Tuomanen HC, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995; 80: 321-30.

Liu Q, Wang Y, Thorlacius H. Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of macrophage inflammatory protein-2 and adhesion of neutrophils to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 364-67.

Luo W, Skalnik DG. Interferon regulatory factor-2 directs transcription from the gp91phox promoter. *J Biol Chem* 1996a; 271: 23445-51.

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* 1996b; 271: 18203-10.

Marden CM, Stefanidis D, Cunningham-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.

Mccord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.

Mckay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor- signaling pathways. *Endocr Rev* 1999; 20: 435-59.

Medzhitov R. CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol* 2001; 2: 15-16.

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: 860-66.

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.

Moynagh GN. The NF- κ B pathway. *J Cell Sci* 2005; 118: 4589-92.

Murdoch-Kinch CA, Miles DA, Poon CK. Hypodontia and nail dysplasia syndrome. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 403-6.

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

Nauseef WM, Volpp BD, Mc-Cormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem* 1991; 266: 5911-17.

Neufeld EJ, Skalnik DG, Lievens PM, Orkin SH. Human CCAAT displacement protein is homologous to the *Drosophila* homeoprotein. *Nat Genet* 1992; 1: 50-55.

Newburger PE. Hematology and oncology. *Curr Opin Pediatr* 1998; 10: 47-8.

Nishida S, Yoshida LS, Shimoyama T, Nunoi H, Kobayashi T, Tsunawaki S. Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome b558 in the activation of the human neutrophil NADPH oxidase. *Infect Immun* 2005; 73: 235-24.

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.

Nissen RM, Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor inhibits NF kappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 2000; 14: 2315-29.

Noh EJ, Ahn KS, Shin EM, Jung SH, Kim YS. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression by dehydroevodiamine through suppression of NF-kappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 2006; 79: 695-701.

Orange JS, Broudeur SR, Jain A, Bonilla FA, Schneider LC, Kretschmer R. Deficient natural killer cell cytotoxicity in patients with IKK- γ NEMO mutations. *J Clin Invest* 2002; 109: 150-09.

Orange JS, Jain AJ, Ballas ZK, Schneider LC, Geha RS, Bonilla FA. The presentation and natural history of immunodeficiency caused by nuclear factor kB essential modulator mutation. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 725-33.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-66.

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, Dinanuer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AI, Orkin SH. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3319-23.

PEDERSEN, K.E., HALLETT, K.B. Treatment of multiple tooth ankylosis with removable prosthesis: case report. *Pediatr Dent* 1994; 6:136-38.

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; 2: 1930-41.

Picard C, Casanova JL. Novel primary immunodeficiencies. *Adv Exp Med Biol* 2005; 568: 89-99.

Ponta H, Cato AC, Herrlick P. Interference of specific transcription factors. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1129: 255-61.

Prando-Andrade C, Agudelo-Florez P, Lopez JA, Souza-Paiva MA de, Costa-Carvalho B, et al. Doença granulomatosa crônica autossômica: relato de caso e análise genético-molecular de dois irmãos brasileiros. *J Pediatr* 2004; 80: 425-28.

Pugh BF. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 2000; 255: 1-14.

Pujols L, Mullol J, Torrego A, Picado C. Glucocorticoid receptors in human airways. *Allergy* 2004; 59: 1042-52.

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.

Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 2002; 416: 291-97.

Reeves EP, Nagl M, Godovac-Zimmermann J, Segal AW. Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte. *J Med Microbiol* 2003; 52: 643-51.

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

Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes* 2006; 20: 1405-28.

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL. Cloning the gene inherited disorder – chronic granulomatous disease, on the basis of its chromosomal. *Nature* 1986; 322: 32-38.

Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. 2. Incorporation of C14-labeled building blocks into lipid, protein, and glycogen of leukocytes during phagocytosis. *J Biol Chem* 1960; 235: 2224-29.

Segal AW, Cross AR, Garcia RC, Borregaard N, Valerius NH, Soothill JF, et al. Absence of cytochrome b-245 in chronic granulomatous disease. A multicenter European evaluation of its incidence and relevance. *N Engl J Med* 1983; 308: 245-51.

Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* 1993; 148: 3-47.

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

Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 197-223.

Segal AW. How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes. *Novartis Found Symp* 2006; 279: 216-9.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-16.

Shehata MF. Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. *Cancer Cell Int* 2005; 5: 10.

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

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

Smahi A, Courtois G, Rabia SH, Doffinger R, Bodemer C, Munnich A, et al. The NF-kB signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2317-75.

Stein B, Yang MX. Repression of interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NFkB and C/EBPβ. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4971-79.

Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *Clin Invest* 2001; 107: 7-11.

Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* 2004; 23: 9247-58.

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

Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle P. A proteasome inhibitor prevents activation of NFkB and stabilizes a newly phosphorylated form of IκB that is still bound to NFkB. *EMBO J* 1994; 13: 5433-41.

Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 103-10.

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

Vinolo E, Sebban H, Chaffotte A, Israel A, Courtois G, Véron M, et al. A point mutation in NEMO associated with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency pathology results in destabilization of the oligomer and reduces lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-mediated NF- κ B activation. *J Bio Chem* 2006; 281: 6334-48.

Voo K, Skalnik DG. Elf-1 and PU.1 Induce Expression of gp91phox Via a Promoter Element Mutated in a Subset of Chronic Granulomatous Disease Patients *Blood* 1999; 93: 3512-20.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin Jr AS. NF κ B Antiapoptosis: induction of TRAF-1 and TRAF-2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-83.

Windhorst DB, Holmes B, Good RA. A newly defined X-linked trait in man with demonstration of the Lyon effect in carrier females. *Lancet* 1967; 1: 737-39.

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

Woodman RC, Newburger PE, Anklesaria P, Erickson RW, Rae J, Cohen MS. 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.

Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol.* 2006; 8: 398-406.

Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition o the NF kappa B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001; 107: 135-42.

Yan MH, Wang LC, Hymowitz SG, Schillbach S, Lee J, Goddard A, et al. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 2000; 290: 523-27.

Yang D, Suzuk IS, Hao, LJ, Fujii Y, Yamauch A, Yamamoto M, et al. Eosinophil-specific regulation of gp91(phox) gene expression by transcription factors GATA-1 and GATA-2. J Bio Chem 2000; 275: 9425-32.

Yang F, Yamashita J, Tang E, Wang HL, Guan K, Wang CY. The zinc finger mutation C417R of I-kappa B kinase gamma impairs lipopolysaccharide- and TNF-mediated NF-kappa B activation through inhibiting phosphorylation of the I-kappa B kinase beta activation loop. J Immunol 2004; 172: 2446-52.

Yoshida LS, Abe S. Tsunawaki, S. Fungal gliotoxin targets the onset of superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun 2000; 268: 716-23.

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

