

Papel do fator nuclear kappa B (NF- κ B) na expressão do gene *NCF1* em leucócitos de indivíduos normais, e pacientes com doença granulomatosa crônica, displasia ectodérmica anidrótica, ou com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ

*Role of nuclear factor kappa B (NF- κ B) on *NCF1* gene expression in leukocytes from normal individuals, and patients with chronic granulomatous disease, anhidrotic ectodermal dysplasia, or with defects in the IL-12/23-IFN- γ axis*

Walmir Cutrim Aragão-Filho¹, Juliana Moreira², Edgar Borges de Oliveira-Júnior³,
Jussara Rehder⁴, Jacinta Bustamante⁵, Jean-Laurent Casanova⁶,
Peter Newburger⁷, Antonio Condino-Neto^{8*}

Resumo

Objetivo: Analisamos a relevância do NF- κ B sobre a expressão do gene *NCF1* em células mielóides U937 selvagens (U937) ou transfectadas com um repressor do NF- κ B (IkBa-S32A/S36A - U937 IkBa-S32A/S36A) ou transfectadas com o vetor vazio (U937 pCMV3) e em células B imortalizadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV) de pacientes com displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID) ou com doença granulomatosa crônica (CGD) devido a mutações no gene *NCF1*, ou de pacientes portadores de defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ .

Métodos: O RNA celular total foi isolado pelo método TRIzol[®]. Os cDNAs foram produzidos utilizando-se o SuperScript[™] III e amplificados por *Real-time PCR* (SYBR[®] Green Master Mix).

Resultados: Células U937 IkBa-S32A/S36A mostraram significativa decréscimo na expressão do gene *NCF1* comparadas com as células U937. A expressão do gene *NCF1* em células EDA-ID S32I foi significativamente menor que em controles saudáveis, assim como em células EDA-ID NEMO/IKK γ X420W na mesma comparação. Estes resultados foram similares aos encontrados em células de pacientes CGD devido à mutação autossômica recessiva no gene *NCF1* quando comparados com o controle normal. Defeitos nos receptores IFNGR1 e IFNGR2 levam à diminuição da expressão do gene *NCF1* ($p < 0,05$, Mann Whitney).

Conclusões: Estes resultados mostram que o NF- κ B é necessário para a expressão do gene *NCF1*, que possivelmente as subunidades p50 e/ou p65 do NF- κ B ligam-se funcionalmente à região "upstream" do gene *NCF1* e que defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ influenciam a expressão do gene *NCF1*.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2009; 32(2):48-53 fator nuclear kappa B, doença granulomatosa crônica, displasia ectodérmica, interleucina 12

Abstract

Objective: We analyzed the relevance of NF- κ B on *NCF1* gene expression in regular myeloid U937 cells (U937), or transfected with a NF- κ B repressor (IkBa-S32A/S36A - U937 IkBa-S32A/S36A), or transfected with the empty vector (U937 pCMV3), and in B cells immortalized by Epstein-Barr virus (EBV) from patients with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency (EDA-ID), or with chronic granulomatous disease (CGD) due to mutations in *NCF1* gene, or from patients with IL-12/23-IFN- γ axis defects.

Methods: Total RNA was isolated by the TRIzol[®] method. The cDNAs were produced by SuperScript[™] III and amplified by *Real-time PCR* (SYBR Green Master Mix).

Results: U937 IkBa-S32A/S36A cells showed significant decrease in the *NCF1* gene expression compared with the U937 cells. The *NCF1* gene expression was significantly lower in EDA-ID S32I cells compared to healthy controls as well as in EDA-ID NEMO/IKK γ X420W cells. These results were similar to those obtained in the CGD patient cells due recessive mutations in the *NCF1* gene compared to healthy controls. Cells from patients with defects in IFNGR1 and IFNGR2 receptors also presented decreased *NCF1* gene expression ($p < 0.05$, Mann Whitney).

Conclusion: These results show that the NF- κ B is necessary for *NCF1* expression, possibly the p50 and/or p65 NF- κ B subunits bind functionally to the *upstream* region of the *NCF1* gene and that IL-12/23-IFN- γ axis defects also influence *NCF1* gene expression.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2009; 32(2):48-53 nuclear factor kappa B, chronic granulomatous disease, anhidrotic ectodermal dysplasia, interleukin 12

1. Bacharelado;
2. Mestrado;
3. Mestrado;
4. Bacharelado;
5. Ph.D.;
6. Ph.D.;
7. Ph.D.;
8. Doutorado.

Instituição à qual o trabalho está vinculado: Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil.

* Trabalho agraciado com o prêmio: Antonio Oliveira Lima durante o XXXV Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia 2008

Artigo submetido em 06.02.2009, aceito em 23.03.2009.

Introdução

O sistema NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase é um complexo enzimático gerador de superóxido, formado por um flavocitocromo *b*₅₅₈, o qual é constituído por duas subunidades proteicas denominadas gp91^{-phox} e p22^{-phox}, e por outros componentes proteicos citoplasmáticos (p47^{-phox}, p67^{-phox}, p40^{-phox}, e uma proteína GTP-ligante)^{1,3}. Defeitos genéticos que afetam os genes da NADPH oxidase dão origem à doença granulomatosa crônica (CGD), uma imunodeficiência primária caracterizada por infecções recorrentes¹.

O fator nuclear κ B (NF- κ B) é um fator de transcrição, envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória, principalmente na resposta linfóide, a qual está bem relatada na literatura. Contudo, nas células da linhagem mielóide, o papel deste fator de transcrição ainda não foi detalhadamente estudado. Este fator é um heterodímero formado por membros da família de genes *rel*^{2,3}. A fosforilação de I κ B, uma família de proteínas inibidoras, por I κ B quinases (I κ B α e I κ B β) em resíduos críticos de serina (Ser32 e Ser36) determina a liberação do NF- κ B para o núcleo celular, onde ele desempenha o seu papel de fator de transcrição⁴.

Neste trabalho, investigamos o papel do NF- κ B na regulação de genes mielóides, especificamente, com respeito ao gene *NCF1*, codificador do componente p47^{-phox} do sistema NADPH oxidase humano, em modelos de linhagem mielocítica U937 e células B transformadas por vírus Epstein-Barr. As células B foram provenientes de pacientes com displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID), ou de células de pacientes com CGD devido à mutação gênica de perda de função para o gene *NCF1*, ou de pacientes portadores de defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ .

Métodos

Células e condições de cultura

A linhagem de células humanas U937 derivadas de um linfoma histiocítico difuso foi obtida da *American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)*. Células U937 transfectadas com um vetor vazio pCMV3 ou com um vetor pCMV3 contendo um constructo *FLAG-tagged* de uma I κ B α com mutações das serinas 32 e 36 a alanina foram gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos V. Paya⁵. A mutação

I κ B S32A/S36A impede a fosforilação da I κ B, levando ao sequestro do NF- κ B no citoplasma.

As células U937 foram cultivadas (0,5-1x10⁶ células/mL) em meio RPMI 1640 completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por aquecimento, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, e 100 μ g/mL de estreptomicina à 37°C em atmosfera úmida (5% de CO₂). Com o objetivo de induzir diferenciação celular, células U937, tipo selvagem ou mutante, foram cultivadas com IFN- γ (100 U/mL) e TNF- α (1000 U/mL) por 48 horas. A viabilidade celular foi verificada no dia do experimento.

Células B EBV transformadas preparadas a partir de células mononucleares de sangue periférico expressam o flavocitocromo *b*₅₅₈ encontrado em fagócitos e possuem atividade NADPH oxidase^{6,7}. As linhagens celulares obtidas de pacientes reproduzem fielmente os defeitos bioquímicos e moleculares presentes na CGD^{6,8}. Células B imortalizadas por EBV foram preparadas de acordo com procedimentos previamente publicados⁶, a partir de doadores saudáveis, pacientes com CGD ligada ao X ou autossômica recessiva, de dois pacientes com displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (EDA-ID), e de pacientes com defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ . As linhagens celulares B EBV transformadas provenientes de pacientes com CGD, EDA-ID e com defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ foram gentilmente cedidas pelo professor Jean-Laurent Casanova (Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U550, Paris, France). O paciente com CGD ligada ao X tem uma mutação no gene *CYBB* caracterizada previamente como uma substituição A>G na posição -2 no sítio de *splice* do intron 9, levando à deleção do exon 10, perda da expressão da gp91^{-phox} e a um decréscimo no *burst* respiratório. Os pacientes com CGD autossômica recessiva tem as seguintes mutações gênicas: *CYBA*, deleção dos exons 2-5; *NCF1*, deleção gt no início do exon 2 (comum à maioria destes casos⁹); e *NCF2*, mutação no sítio de *splice* no exon 4.

Para os ensaios com pacientes com defeito no eixo IL-12/23-IFN- γ , linfócitos B-EBV de seis controles normais e seis pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN- γ (tabela 1) foram ativados com IFN- γ na proporção de 10³UI em 500 μ l de RPMI para cada 2,5x10⁶ células durante 15 minutos, à 37°C. A reação foi interrompida com PBS 1x gelado, o conteúdo foi centrifugado à 1800rpm durante cinco minutos à 4°C, e as células foram ressuspensas em TRIzol[®], para extração de RNA.

Tabela 1 - Pacientes com defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ avaliados neste estudo.

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

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

Linhagens de células B EBV transformadas foram obtidas de pacientes com EDA-ID previamente descritos e que apresentam infecções recorrentes graves. Um paciente tem EDA-ID ligada ao X causada por uma mutação hipomórfica hemizigótica no gene codificador do NEMO/IKK γ (X420W), a subunidade regulatória do complexo I κ B quinase (IKK¹⁰), levando ao decréscimo da ativação do NF- κ B nas células deste paciente^{11,12}. O segundo paciente tem uma forma autossômica dominante de EDA-ID associada com uma muta-

ção hiper mórfica heterozigótica (S32I) na serina 32 da I κ B α ¹³. Esta mutação de ganho de função aumenta a capacidade inibidora da I κ B α pela prevenção de sua fosforilação e degradação, resultando na diminuição da ativação do NF- κ B¹³.

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

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

RNA total foi isolado de células U937 ou células B EBV transformadas (10^7 células) por Trizol (TRIZOL® Reagent, INVITROGEN15596-026), de acordo com as instruções do fabricante. Transcrições reversas de 4 µg do RNA total foram feitas utilizando-se SuperScript III RT e hexâmeros randômicos. Os cDNAs foram amplificados por *real-time PCR* usando-se SYBR® Green Real Time System (Applied Biosystems). Cada 25 µL de mix de PCR continha 12 ng/µL de cDNA, 8 µL de SYBR® Green Master Mix (1X SYBR® Green Buffer, 3 mM MgCl₂, 200 nM mix de dNTP, 0,63 U Amplitaq Gold®, 0,25 U AmpErase®), e os seguintes primers específicos: p47^{phox} (Gene Bank NM_000256) *forward* primer 5'-CCT CTT TCC AGT GCA TTT AAG G-3', *reverse* primer 5'-GAT GTG ACG GAT GAA GGT GTC-3'. As condições de ciclo de temperatura para o aparelho ABI 7500 thermal cycler foram: 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos e então 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Depois de 40 ciclos, uma curva de dissociação (*melting curve*) foi gerada no intervalo de 60°C a 95°C. A amplificação paralela de β actina (Gene Bank NM 001101) foi usada para normalizar a quantidade de amostra. As reações foram feitas em triplicata e os resultados representam a média ± S.E.M. Curvas padrões para o produto de amplificação foram geradas a partir de diluições de dez vezes de *pools* de cDNAs para a determinação da eficiência dos primers.

Análise computacional sobre possíveis sítios de ligação do NF-κB ao gene *NCF1*

Buscando identificar possíveis sítios de ligação do NF-κB ao gene *NCF1* (região genômica: chr7:73826245-73841594), utilizamos a ferramenta "ECR Browser" (ECR do Inglês: "Evolutionary Conserved Elements"), localizada no site: <http://ecrbrowser.dcode.org/>. Esta ferramenta permite-nos fazer comparações entre o genoma humano e diversos outros genomas de espécies evolutivamente mais ou menos distantes à espécie humana. Através destas comparações podemos identificar sítios genômicos conservados durante a evolução, sobre os quais podemos inferir a existência de funcionalidade biológica¹⁴⁻¹⁶. Depois dessa análise

comparativa, procuramos por sítios de ligação do NF-κB dentro dos sítios conservados encontrados, através da ferramenta "Mulan" (do Inglês: "Multiple sequence Local Alignment and conservation visualization tool").⁽¹⁶⁾ Assim, utilizando sequências genômicas conservadas entre o genoma humano e o de outras espécies como base para a procura de possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição, podemos eliminar grande parte da ocorrência de falsos positivos sobre os possíveis sítios de ligação do NF-κB ao nosso gene de interesse. Procuramos por sítios de ligação conservados para as subunidades p50 e/ou p65 do NF-κB em regiões exônicas, intrônicas e flanqueadoras (20000 Kb "upstream" e "downstream") em relação ao nosso gene de interesse. Intervalo genômico pesquisado para o gene *NCF1*: chr7:73806245-73861594.

Procuramos por elementos conservados evolutivamente compartilhados com pelo menos cinco espécies diferentes de vertebrados: *Mus musculus*, *Macaca mulatta* e *Pan troglodytes* evolutivamente mais próximas ao genoma humano e as espécies de peixe *Danio rerio* e *Fugu rubripes*, evolutivamente mais distantes. Para tornar a nossa busca mais apurada, utilizamos os seguintes parâmetros: no programa "ECR Browser", existência de pelo menos 85% de similaridade entre as sequências gênicas consideradas conservadas; no programa "TRANSFAC professional V10.2", o índice de similaridade de matriz de pelo menos 0.85 para as regiões de sítios de ligação para as subunidades do NF-κB analisadas.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± S.E.M. Estatísticas descritivas foram feitas e comparações entre os grupos foram estabelecidas pelo teste de Mann Whitney. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Como mostrado na figura 1, há inibição da expressão gênica do *NCF1* no subclone de células U937 transfectadas com o inibidor IκB S32A/S36A, comparada a células U937 selvagens ou a células transfectadas com vetor vazio ($p < 0,05$; $n = 4$; Mann Whitney mono-caudal).

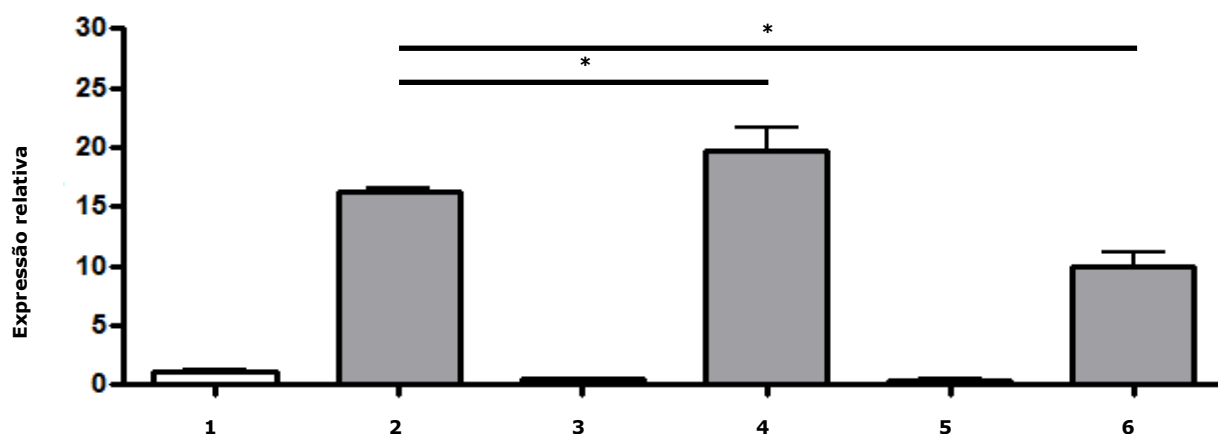


Figura 1 - Expressão do gene *NCF1* em células U937 induzidas (2, 4 e 6) ou não (1, 3 e 5) à diferenciação por IFN-γ e TNF-α. U937 = 1 e 2, U937 pCMV3 = 3 e 4, U937 IκB S32A/S36A = 5 e 6 (* $p < 0,05$; $n = 4$; Mann Whitney mono-caudal).

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

A figura 2 mostra a expressão do gene *NCF1* em linhagens de células B EBV transformadas de pacientes com EDA-ID comparada à de controles saudáveis e de pacientes com CGD ligada ao X ou com CGD autossômica recessiva devido a defeitos nos componentes p22^{phox}, p47^{phox} ou p67^{phox} da NADPH oxidase. A expressão do gene *NCF1* na linhagem celular EDA-ID devido à mutação IκB S32I foi significativamente menor do que na linhagem celular de

doadores saudáveis ou nas linhagens celulares de pacientes com CGD ($p < 0,05$; $n = 4$; Mann Whitney mono-caudal) e esta foi equivalente à encontrada em linhagem celular de paciente com CGD devido a defeitos no componente $p47^{\text{phox}}$. A linhagem celular EDA-ID devido à mutação $\text{I}\kappa\text{B S32I}$ mostrou decréscimo da expressão do *NCF1*, similarmente ao que foi observado em células U937 transfectadas com

$\text{I}\kappa\text{B S32A/S36A}$, sugerindo que a expressão deste gene também é sensível à diminuição da funcionalidade do $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Também observamos decréscimo da expressão do gene *NCF1* nas células B EBV de pacientes com mutação NEMO/ $\text{IKK}\gamma$ X420W comparada à vista nas células de doadores saudáveis.

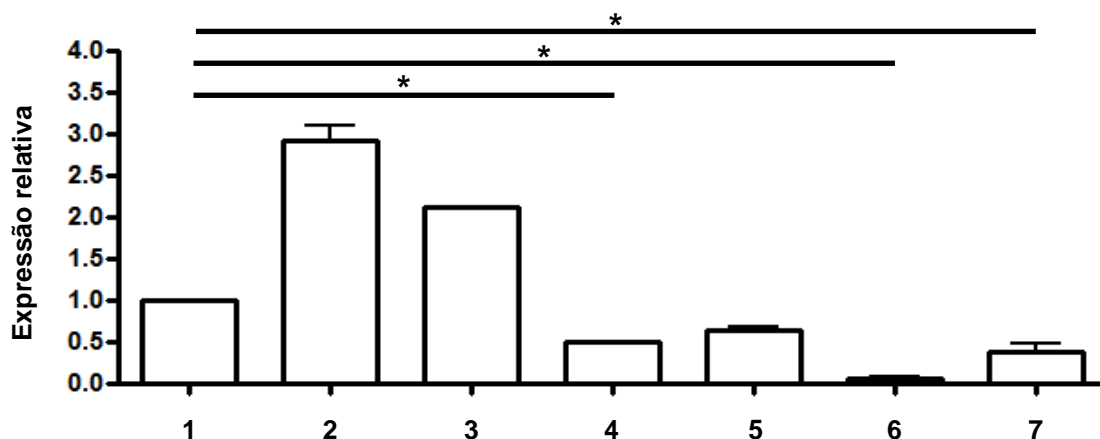


Figura 2 - Expressão do gene *NCF1* em células B EBV transformadas. As linhagens de células B foram derivadas de: 1, doadores saudáveis; 2, paciente com CGD ligada ao X; 3, paciente com CGD devido à mutação autossômica no gene *CYBA* (A22-CGD); 4, paciente com CGD devido à mutação autossômica no gene *NCF1* (A47-CGD); 5, paciente com CGD devido à mutação autossômica no gene *NCF2* (A67-CGD); 6, paciente com EDA-ID devido à mutação $\text{I}\kappa\text{B S32I}$; 7, paciente com EDA-ID devido à mutação NEMO/ $\text{IKK}\gamma$ X420W ($p < 0,05$; $n = 4$; Mann Whitney mono-caudal).

Através da análise computacional empregada para identificar possíveis sítios de ligação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$, subunidades $p50$ e/ou $p65$, ao gene *NCF1*, encontramos 23 possíveis sítios de ligação conservados entre o genoma humano e o do macaco rhesus e 51 entre o genoma humano e o do chimpanzé, não foram encontrados possíveis sítios de ligação entre o genoma humano e o do camundongo, bem como com respeito às espécies de peixes estudadas. Não encontramos possíveis sítios de ligação conservados entre os quatro genomas estudados (do camundongo, do macaco rhesus, do chimpanzé e o do homem), mas encontramos 23 possíveis sítios de ligação conservados entre os genomas do macaco rhesus, do chimpanzé e o do homem (figura 3).

Nas células de pacientes com defeito no eixo $\text{IL-12/23-IFN-}\gamma$, os defeitos IFNGR1 c e IFNGR1 pd foram os que mais ocasionaram menor expressão do gene *NCF1*, sendo que todos os demais defeitos, com exceção do IFNGR1 pr , também ocasionaram a diminuição da expressão deste gene. O tratamento com $\text{IFN-}\gamma$ não foi capaz de alterar o nível de expressão do gene *NCF1* nestes pacientes (figura 4).

Discussão

Nossos experimentos por *real-time PCR* mostram que células transfectadas com o $\text{I}\kappa\text{B S32A/S36A}$ possuíam níveis diminuídos de expressão do gene *NCF1*. Este resultado está de acordo com a hipótese de que o $\text{NF-}\kappa\text{B}$ estaria envolvido na regulação da expressão do gene *NCF1*, porém este não seria o único fator transcricional envolvido na transcrição deste gene, uma vez que a expressão do gene *NCF1* nas células U937 $\text{I}\kappa\text{B S32A/S36A}$ não foi completamente abolida. Esta última consideração está de acordo com a literatura, uma vez que outros fatores transcricio-

nais já foram relatados como envolvidos na expressão do gene em questão¹⁷⁻¹⁹.

Pudemos constatar a existência de possíveis sítios de ligação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ conservados na região *upstream* intergênica em relação aos gene *NCF1* (sítios conservados entre o genoma humano e o das espécies *M. mulatta* e *P. troglodytes*). Como as regiões gênicas promotoras estão localizadas na região flangeadora *upstream* intergênica às regiões transcritas dos genes, a ocorrência de possíveis sítios de ligação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ conservados nesta localização nos fornece subsídios para a realização de experimentos de banda (tais como ensaios EMSA, do Inglês: "Electro Mobility Shift Assay") sobre a funcionalidade dos mesmos.

Nossos resultados em células humanas mielocíticas confirmam e estendem os relatos prévios feitos por Anrather *et al.*²⁰. Por outro lado, defeitos nos componentes da ativação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ podem resultar em um grupo heterogêneo de imunodeficiências²¹⁻²⁴. Uma forma de ativação defeituosa do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ deriva de mutações hipomórficas em genes codificadores de proteínas quinases responsáveis pela fosforilação da $\text{I}\kappa\text{B}$ no complexo $\text{I}\kappa\text{B}$ quinase pela unidade regulatória NEMO. A síndrome clínica resultante, EDA-ID, pode ser herdada tanto como uma mutação recessiva ligada ao X quanto por uma mutação autossômica recessiva ou dominante²¹⁻²⁴.

Células B EBV transformadas mimetizam desordens genéticas da NADPH oxidase^{6,7} e provêm um modelo útil para a avaliação destas desordens moleculares. Células B EBV transformadas do paciente EDA-ID com a mutação S32I na $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mostraram diminuição da expressão do gene *NCF1*, de maneira semelhante à células B de pacientes com CGD por deficiência na $p47^{\text{phox}}$, confirmando os achados nas células U937 transfectadas com $\text{I}\kappa\text{B S32A/S36A}$. Estes resultados sugerem um mecanismo adicional para a susceptibilidade a infecções por parte de pacientes com EDA-

ID¹⁰⁻¹³, assim como o defeito molecular na ativação do NF-κB também parece afetar células da linhagem mielóide. Também observamos decréscimo da expressão do gene *NCF1* nas células B EBV de pacientes com mutação NEMO/

IKKγ X420W, mutação esta que também compromete a via de sinalização do NF-κB, o que também vem a demonstrar a importância deste fator de transcrição na expressão do gene *NCF1*.

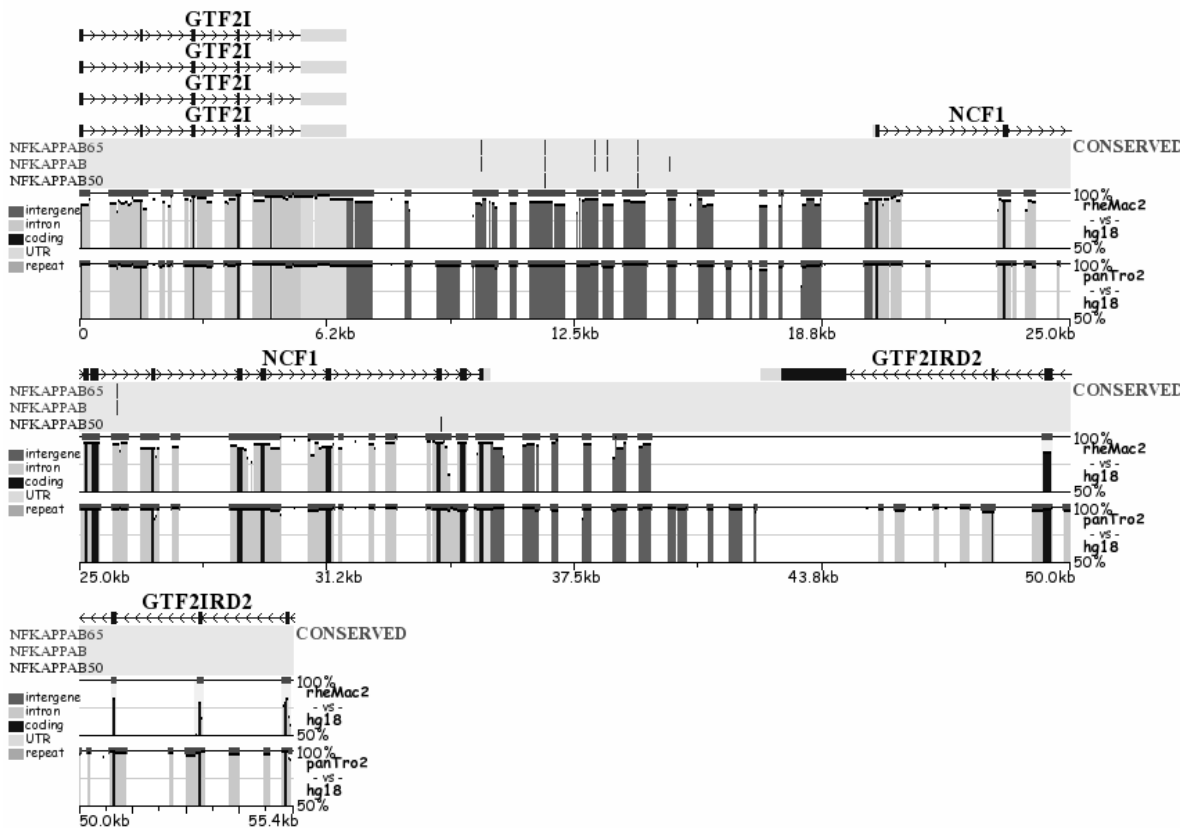


Figura 3 - Localização esquemática dos possíveis sítios de ligação do NF-κB (subunidades p50 e/ou p65), conservados entre as espécies *Macaca mulatta* (macaco rhesus, rheMac2 chr3:52035655-52247231), *Pan troglodytes* (chimpanzé, panTro2 chr7:74367142-74612050) e o homem (*Homo sapiens*, hg18 chr7:73806245-73861594), com relação ao gene *NCF1*. Análise computacional empregando a ferramenta "ECR Browser" (<http://ecrbrowser.dcode.org/>).

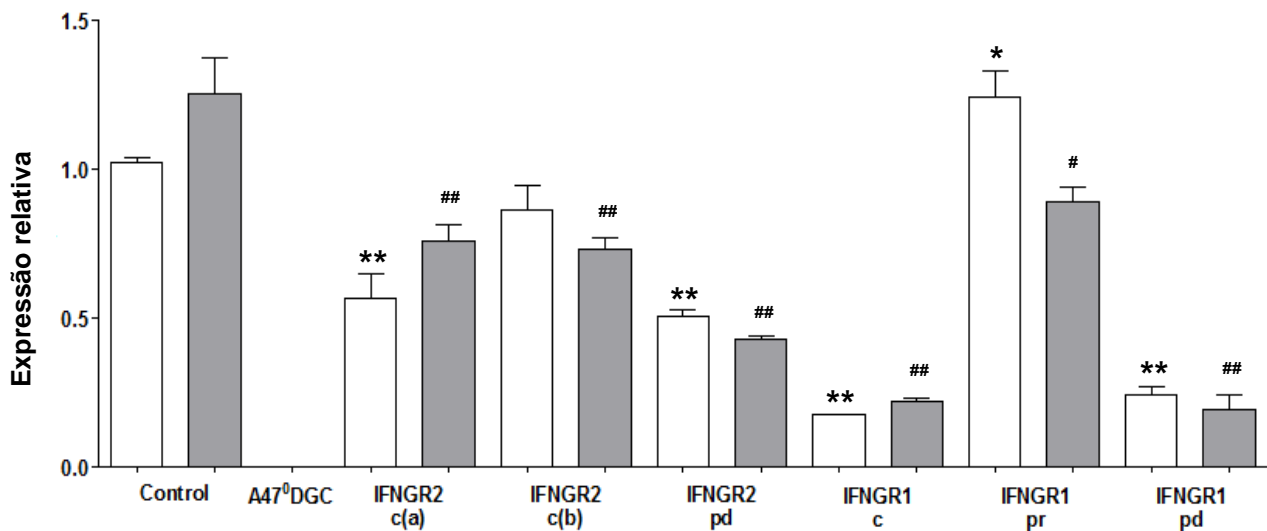


Figura 4 - Expressão do gene *NCF1* em células de pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN-γ. *p<0,05, **p<0,01 quando comparado com o grupo controle espontâneo. #p<0,05, ##p<0,01 quando comparado com o grupo controle estimulado com IFN-γ (n = 4; Mann Whitney mono-caudal). Barras escuras representam o tratamento com IFN-γ, barras claras representam a ausência deste tratamento.

O presente estudo sugere que defeitos comuns na atividade da NADPH oxidase podem prover uma base para a sobreposição clínica existente entre casos de CGD, EDA-ID e defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ . Não existem dados na literatura sobre as consequências dos defeitos do eixo IL-12/23-IFN- γ sobre a expressão gênica do componente p47^{phox} do sistema NADPH oxidase humano, assim, estudamos o papel deste eixo sobre a expressão gênica deste componente.

Os resultados obtidos mostram que o IFN- γ é importante para a expressão de componentes do sistema NADPH oxidase, de tal forma que pacientes com defeitos no receptor de IFN- γ podem ser comparáveis a um paciente com doença granulomatosa crônica (CGD) devido a defeitos genéticos que levam ao decréscimo da expressão do gene *NCF1*. Observamos que a expressão do gene *NCF1* é mais influenciada por defeitos IFNGR1 c e IFNGR1 pd. Todos os demais defeitos, com exceção do IFNGR1 pr, também ocasionaram a diminuição da expressão deste gene. O NF- κ B pode estar envolvido neste processo de influência da expressão do gene *NCF1* na medida em que ele pode estar sendo afetado pela não funcionalidade dos receptores de IFN- γ em pacientes com defeitos nos genes *IFNGR1* e *IFNGR2*.

O NF- κ B é necessário para a expressão do gene *NCF1* e, conseqüentemente, para a atividade da NADPH oxidase. As análises computacionais sobre os possíveis sítios de ligação funcionais para as subunidades p50 e/ou p65 do NF- κ B em região *upstream* ao sítio de início de transcrição do gene estudado, juntamente com os dados de expressão gênica obtidos nos modelos de linhagens celulares estudados, apontam para uma possível ligação funcional do NF- κ B ao gene *NCF1*. Defeitos na via de ativação do NF- κ B encontrados em certas formas de displasia ectodérmica levam a um defeito funcional similar ao encontrado em leucócitos de pacientes com CGD, em células mielóides, em adição aos conhecidos defeitos imunológicos mielóides e linfóides, e podem contribuir para a imunodeficiência severa. Pacientes com distúrbios no *burst* oxidativo, além de CGD, também devem ser avaliados com respeito à existência de defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ e defeitos na via do NF- κ B.

Referências

- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16:42-7.
- Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene* 2006; 25:67-76.
- Nauseef WM. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:277-91.
- Pennington KN, Taylor JA, Bren GD, Paya CV. IkappaB kinase-dependent chronic activation of NF- κ B is necessary for p21(WAF1/Cip1) inhibition of differentiation-induced apoptosis of monocytes. *Mol Cell Biol* 2001; 21:1930-41.
- Asin S, Taylor JA, Trushin S, Bren G, Paya CV. IkappaB mediates NF- κ B activation in human immunodeficiency virus-infected cells. *J Virol* 1999; 73:3893-903.
- Condino-Neto A, Newburger PE. NADPH oxidase activity and cytochrome *b*₅₅₈ content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. *Arch Biochem Biophys* 1998; 360:158-64.
- Volkman DJ, Buescher, ES, Gallin JI, Fauci AS. B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: superoxide generation in chronic granulomatous disease and granules in Chediak-Higashi syndrome. *J Immunol* 1984; 133:3006-9.
- Dusi S, Nadalini KA, Donini M, et al. Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly and activation in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines of normal and chronic granulomatous disease patients. *J Immunol* 1998; 161:4968-74.
- Chanock SJ, Barrett DM, Curnutte JT, Orkin SH. Gene structure of the cytosolic component phox-47 and mutations in autosomal recessive chronic granulomatous disease [abstract]. *Blood* 1991; 78:165a.
- Döffinger R, Smahi A, Bessia C, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- κ B signaling. *Nat Genet* 2001; 27:277-85.
- Dupuis-Girod S, Corradini N, Hadj-Rabia S, Fournet JC, Faivre L, Le Deist F, Durand P, Döffinger R, Smahi A, Courtois G, et al. Osteopetrosis, lymphedema, anhidrotic ectodermal dysplasia, and immunodeficiency in a boy and incontinentia pigmenti in his mother. *Pediatrics* 2002; 109:97.
- Dupuis-Girod S, Cancrini C, Le Deist F, et al. Successful allogeneic hemopoietic stem cell transplantation in a child who had anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Pediatrics* 2006; 118:e205-e11.
- Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Döffinger R, Cancrini C, Bonnet M, et al. A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* 2003; 112:1108-15.
- Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32:W280-W6.
- Ovcharenko I, Stubbs L, Loots GG. Interpreting mammalian evolution using Fugu genome comparisons. *Genomics*. 2004; 84:890-5.
- Ovcharenko I, Loots GG, Giardine BM, et al. Mulan: Multiple-sequence local alignment and visualization for studying function and evolution. *Genome Research*. 2005;15:184-94.
- Berasi SP, Xiu M, Yee AS, Paulson KE. HBP1 repression of the p47phox gene: cell cycle regulation via the NADPH oxidase. *Mol Cell Biol*. 2004;24:3011-24.
- Li SL, Schlegel W, Valente AJ, Clark RA. Critical flanking sequences of PU.1 binding sites in myeloid-specific promoters. *J Biol Chem*. 1999;274:32453-60.
- Verbeek W, Lekstrom-Himes J, Park DJ, Dang PM-C, Vuong PT, Kawano S, Babior BM, Xanthopoulos K, Koeffler HP. Myeloid transcription factor C/EBP ϵ is involved in the positive regulation of lactoferrin gene expression in neutrophils. *Blood*. 1999; 94:3141-50.
- Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91 phox. *J Biol Chem*. 2006;281:5657-67.
- Nishikomori R, Akutagawa H, Maruyama K, et al. X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival. *Blood* 2004; 103:4565-72.
- Kim S, La Motte-Mohs RN, Rudolph D, Zuniga-Pflucker 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; 100:1203-8.
- Puel A, Picard C, Ku CL, Smahi A, Casanova JL. Inherited disorders of NF- κ B-mediated immunity in man. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:34-41.
- Puel A, Reichenbach J, Bustamante J, Ku CL, Feinberg J, Döffinger R, et al. The NEMO mutation creating the most-*upstream* premature stop codon is hypomorphic because of a reinitiation of translation. *Am J Hum Genet* 2006;78: 691-701.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP pelo suporte financeiro concedido ao trabalho.

Correspondência:

Antonio Condino Neto
Av. Professor Lineu Prestes, 1730
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" - Butantã
05508-000 - São Paulo - SP
Fone/Fax: 0XX-11-3091.7387
Email: condino@icb.usp.br.