

Avaliação do NF- κ B na regulação gênica do sistema NADPH oxidase em pacientes com displasia ectodérmica com imunodeficiência

Evaluation of NF- κ B in gene regulation of NADPH oxidase system in patients with ectodermal dysplasia with immunodeficiency

Paolo Ruggero Errante¹, Francisco Sandro Menezes Rodrigues², Renato Ribeiro Nogueira Ferraz³

¹Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Imunologia, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP - Brasil.

²Farmacêutico, Mestre e Doutor em Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, SP - Brasil.

³Biólogo, Mestre e Doutor em Nefrologia, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Professor Permanente do Programa de Mestrado Profissional em Administração, Gestão de Sistemas de Saúde-PMPA-GSS - Universidade Nove de Julho - UNINOVE. São Paulo, SP - Brasil.

Resumo

Introdução: A displasia ectodérmica anidrótica com imunodeficiência (DEA) é uma doença caracterizada por mutações nos genes que codificam o NF- κ B. **Objetivo:** Avaliar o efeito do NF- κ B na regulação gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase de pacientes com DEA. **Métodos:** Sangue periférico de pacientes com DEA e indivíduos saudáveis foram coletados para a separação de células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico e as células B foram imortalizadas com vírus Epstein-Barr (B-EBV) para produção de ânion superóxido e extração de RNA para reação em cadeia da polimerase em tempo real dos componentes do sistema NADPH oxidase. **Resultados:** A produção de ânion superóxido e a expressão dos genes *NCF1* e *NCF2* de pacientes DEA foi estatisticamente menor quando comparado com o grupo controle. **Conclusão:** O NF- κ B é necessário para a expressão dos genes *NCF1* e *NCF2* do sistema NADPH oxidase e produção de ânion superóxido, importantes na defesa contra microrganismos.

Descritores: Displasia ectodérmica anidrótica; Imunodeficiência; NADPH oxidase; Radicais livres.

Abstract

Introduction: Anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency (AED) is a disease characterized by mutations in the genes encoding NF- κ B. **Objective:** To evaluate the effect of NF- κ B in gene regulation of NADPH oxidase components of patients with AED. **Methods:** Peripheral blood of patients with AED and healthy individuals were collected for separation of mononuclear cells obtained from peripheral blood and B cells were immortalized with Epstein-Barr virus (B-EBV) to produce superoxide anion and RNA extraction for polymerase chain reaction in real time of NADPH oxidase components. **Results:** The production of superoxide anion and the expression of *NCF1* and *NCF2* genes in AED patients was statistically lower when compared to the control group. **Conclusion:** NF- κ B is required for the expression of *NCF1* and *NCF2* genes of NADPH oxidase system and superoxide anion production, important in the defense against microorganisms.

Keywords: Ectodermal dysplasia anhidrotic; Immunodeficiency; NADPH oxidase; Free radicals.

Introdução

Os fagócitos possuem em suas membranas celulares o sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase que durante a fagocitose, promove produção de radicais livres derivados do oxigênio, essenciais para a função microbicida¹.

A ativação da NADPH oxidase requer a união do flavocitocromo b_{558} com as proteínas citosólicas p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e uma proteína ligante de GTP, a Rac1 em macrófagos ou Rac2 em neutrófilos²⁻⁴. O componente gp91^{phox} da NADPH oxidase é codificado pelo gene *CYBB*⁵, e o gene *CYBA* codifica a subunidade p22^{phox}⁶. O gene *NCF1* codifica a subunidade p47^{phox}⁷, ao passo que o gene *NCF2* codifica a subunidade p67^{phox}³, e o gene *NCF4* a subunidade p40^{phox}⁸ da NADPH oxidase.

O NF- κ B é um heterodímero formado por membros da família de genes Rel, que inclui as subunidades p105/p50, p100/p52, p65 (RelA), RelB, e c-Rel⁹. Na sua ativação (p50/RelA) ocorre sua fosforilação, ubiquitinação e degradação no proteossomo. Isto leva a liberação do heterodímero que se desloca para o núcleo, ativando genes ligados a produção de imunoglobulinas, resposta imune e inflamação¹⁰.

A displasia ectodérmica anidrótica (DEA) é uma condição clínica heterogênea caracterizada por desenvolvimento anormal de estruturas derivadas do ectoderma, como dentes, cabelos, nariz e glândulas exócrinas. Pacientes com DEA apresentam mutações nos genes que codificam o heterodímero NF- κ B alterando a resposta inflamatória, e apresentam infecções recorrentes graves, que afetam o trato respiratório, gastrointestinal, pele e ossos¹¹.

Uma vez que o NF- κ B é importante para a resposta inflamatória, produção de radicais livres e defesa contra microrganismos, foi avaliada a produção de ânion superóxido e a expressão dos genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4* em células B imortalizadas pelo vírus Epstein-Barr de pacientes com DEA.

Material e Métodos

Pacientes

Foram incluídos no estudo pacientes com DEA (n=10), que apresentaram graves infecções de repetição do trato respiratório e gastrintestinal, com significativa alteração do burst oxidativo avaliado pelo teste Nitro Blue Tetrazolium (NBT), acompanhado de respectivo grupo controle sadio (n=10), foram atendidos no Ambulatório da Disciplina de Alergia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, no período de 2010 a 2014. Todos os procedimentos 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, conforme resolução 466/2012.

Obtenção de células do sangue periférico

Sangue periférico dos pacientes com DEA e indivíduos saudáveis foram coletados em frascos de polipropileno estéreis contendo heparina. O sangue coletado foi diluído volume/volume em DMEM (Gibco) estéril, e centrifugado (Isolymp, Gallard-Scheleisinger Ind., Carle Place, NY, EUA) a 400 g por 20 minutos a 20°C. A camada de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi coletada. As células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS) (NaCl 0,14 M; Na₂PO₄ 0,01 M; pH 7,2), e quantificadas; sua viabilidade foi avaliada pela utilização de Trypan blue (Sigma Chemical Co.).

Imortalização dos linfócitos B pelo vírus de Epstein-Barr

Células B transformadas com o vírus de Epstein-Barr (B-EBV) foram preparadas a partir de células mononucleares de sangue periférico previamente coletadas. PBMC de pacientes com DEA e indivíduos saudáveis foram cultivadas

com sobrenadantes da linhagem B95-8, produto do EBV¹², em meio DMEM + 5 % soro humano AB⁺, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, 37°C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO₂.

Como células B-EBV transformadas expressam o flavocitocromo b₅₅₈ encontrado em fagócitos e possuem atividade NADPH oxidase, pode-se obter células capazes de serem mantidas *in vitro* por longo período, evitando a coleta repetida de amostras de sangue dos pacientes.

Liberação de ânion superóxido por células B imortalizadas com EBV

A liberação de superóxido foi determinada por espectrofotometria através da redução do citocromo c especificamente inibida pela superóxido dismutase (SOD) em ensaio modificado¹³. A quantidade de superóxido liberada foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de 0,21 nM⁻¹ cm⁻¹, e os resultados expressos em nmol de superóxido liberado por 10⁶ células/hora.

Extração de RNA

O RNA total das células de pacientes com DEA e indivíduos saudáveis foi isolado a partir de células B-EBV transformadas (10⁷ células) estimuladas por 48 horas [IFN- γ , 1.0 x10³ UI/mL (Boehringer Ingelheim), na proporção de 500 μ L de RPMI para cada 2,5 x 10⁶ células, a 37°C], utilizando Trizol (TRIzol[®] Reagent, InVitrogen15596-026). O RNA foi recuperado após precipitação com álcool isopropílico¹⁴.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Para as transcrições reversas, 3 μ g do RNA total foi produzido utilizando-se SuperScript II RT e hexâmeros randômicos. Os cDNAs foram amplificados por real-time PCR usando SYBR Green Real Time System (Applied Biosystems). Cada 25 μ L de mix de PCR continha 12 ng/ μ L de cDNA, 8 μ L de SYBR[®] Green Master Mix

(1X SYBR[®] Green Buffer, 3 mM MgCl₂, 200 nM mix de dNTP, 0,63 U Amplitaq Gold[®], 0,25 U AmpErase[®]), e primers específicos: gp91^{phox} (Gene Bank NM 00397) *forward* primer 5'-TTG TGG AAA CCC TCC TAT GA -3', *reverse* primer 5'-AAA ACC GCA CCA ACC TCT CA-3'; p47^{phox} (Gene Bank NM) *forward* primer (5'-CCT CTT TCC AGT GCA TTT AAG G-3'), *reverse* primer 5'-GAT GTG ACG GAT GAA GGT GTC-3'; p67^{phox} (Gene Bank NM) *forward* primer 5'-CGG ACA AGA AGG ACT GGA AG -3', *reverse* primer 5'-GGA AGT AAG CCA CTG CCA AG-3'; p22^{phox} (Gene Bank NM) *forward* primer 5'-ATG TGG GCC AAC GAA CAG-3', *reverse* primer 5'-GTA CTC CAG CAG GCA CAC AA-3'; p40^{phox} (Gene Bank NM) *forward* primer 5'-GGC CGA GAG TGA CTT TGA AC-3', *reverse* primer 5'-TCA CCT CGA TGA CGA AAA CA-3'; e β actina (Gene Bank NM) *forward* primer 5'- TCA CCG AGC GCG GCT-3', *reverse* primer 5'-TAA TGT CAC GCA CGA TTT CCC-3'.

As condições de ciclo de temperatura utilizando o aparelho ABI 5700 thermal cycler foram: gp91^{phox}: 50°C por 2 min., 95°C por 10 min., 35 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min. As condições de ciclo de temperatura utilizando o aparelho ABI 7500 thermal cycler foram: p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox}: 50°C por 2 min., 95°C por 10 min., e 40 ciclos de 95°C por 15 seg., e 60°C por 1 min.

Depois de 35 ciclos (ABI 5700 thermal cycler) ou 40 ciclos (ABI 7500 thermal cycler), uma curva de dissociação (*melting curve*) foi gerada no intervalo de 60°C a 95°C. A amplificação paralela de β actina (Gene Bank NM 001101) foi usada para normalizar a quantidade de amostra. As reações foram feitas em triplicata e os resultados representam a média \pm DP.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm DP. Estatísticas descritivas foram feitas e a comparação entre os grupos foi estabelecida pelo teste ANOVA. Valores de p<0,05 foram considerados significativos.

Resultados

A tabela 1 apresenta as características clínicas, onde 60% dos pacientes apresentaram diarreia e 50% sinusite. Todos apresentaram alterações cutâneas compatíveis com a DEA. O burst oxidativo demonstrou uma baixa redução do NBT.

O gráfico 1 apresenta os resultados obtidos a partir da estimulação com PMA (30 nmolar) de células B-EBV transformadas para determinação da produção de ânion superóxido. Células B-EBV transformadas de pacientes com DEA apresentaram menor produção de ânion superóxido quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$, Teste ANOVA).

O gráfico 2 representa a expressão do gene *CYBB* a partir de células B-EBV de pacientes com DEA comparada ao grupo controle. A expressão do gene *CYBB* (gp91^{phox}) em células B-EBV transformadas de pacientes com DEA foi semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$; Teste ANOVA).

O gráfico 3 demonstra que a expressão do gene *CYBA* (p22^{phox}) de células B-EBV transformadas de pacientes com DEA foi semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$; Teste ANOVA).

O gráfico 4 representa a expressão do gene *NCF1* (p47^{phox}), e o gráfico 5 a expressão do gene *NCF2* (p67^{phox}) de células B-EBV transformadas de pacientes com DEA, que foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Teste ANOVA).

O gráfico 6 mostra que a expressão do gene *NCF4* (p40^{phox}) em células B-EBV transformadas de pacientes com DEA foi semelhante ao do grupo controle ($p > 0,05$; Teste ANOVA).

Discussão

Foi investigado o papel do NF- κ B sobre a produção de ânion superóxido e expressão dos componentes gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox} do sistema NADPH oxidase de pacientes com DEA que apresentavam infecções de repetição do trato respiratório e gastrointestinal e baixa resposta ao teste NBT. Foi verificada diminuição da síntese de ânion superóxido e diminuição da expressão dos genes *NCF1* e *NCF2* em células B-EBV de pacientes com DEA.

Tabela 1: Achados clínicos e produção de ânion superóxido por PBMC de pacientes com DEA. No teste de redução do NBT, o sal solúvel amarelo oxidado é reduzido a formazan azul escuro insolúvel, após incubação de leucócitos com NBT e coloração com Wright-Giemsa. *Valores normais no teste estimulado de redução do NBT entre 10-50% de células NBT positivas

Pacientes	Trato respiratório	Trato digestório	Pele	NBT* Células positivas (%)
1	Sinusite	Diarréia	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	4,0
2	Sinusite	Diarréia	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	8,0
3	Sinusite	-	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	4,0
4	Pneumonia	Gastrite (<i>H. pylori</i>)	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	8,0
5	-	Diarréia	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	9,0
6	Pneumonia	Gastrite	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	7,0
7	Sinusite	Diarréia	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	7,0
8	Bronquite	-	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	9,0
9	Asma	Diarréia	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	4,0
10	Sinusite	Diarréia	Ausência de pelos, dentes cônicos, rarefação pilosa, pele xerótica	6,0

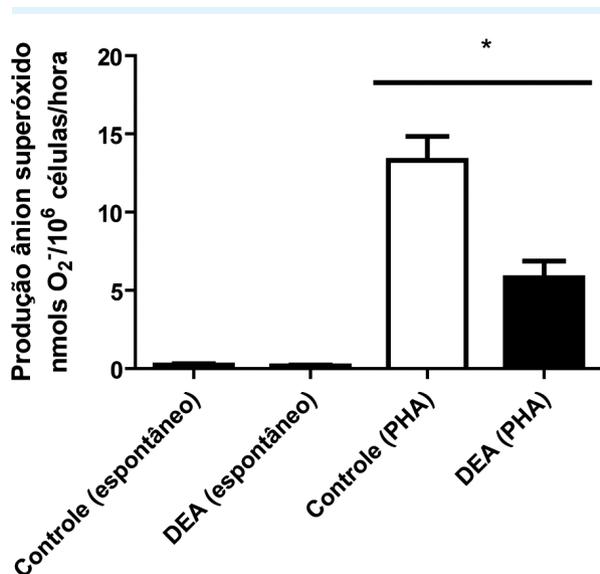


Figura 1: Geração de ânion superóxido por células B-EBV de pacientes com DEA e indivíduos saudáveis

Células estimuladas com PHA (30 nmolar) de pacientes com DEA apresentam menor liberação de superóxido, em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$, $n = 10$, teste ANOVA).

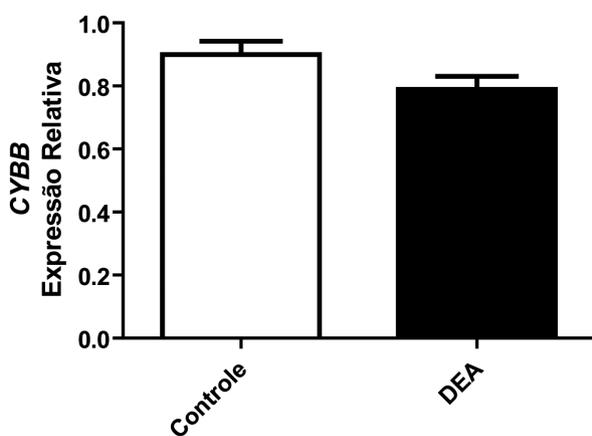


Figura 2: Expressão relativa do gene *CYBB* por real-time PCR

A expressão do *CYBB* (gp91^{phox}) em células B-EBV transformadas de pacientes com DEA foi semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$; Teste ANOVA).

Estes resultados reforçam a hipótese de que defeitos na via de ativação do NF- κ B observados em células B-EBV de pacientes com DEA levam a um defeito funcional similar ao encontrado em leucócitos de pacientes com Doença

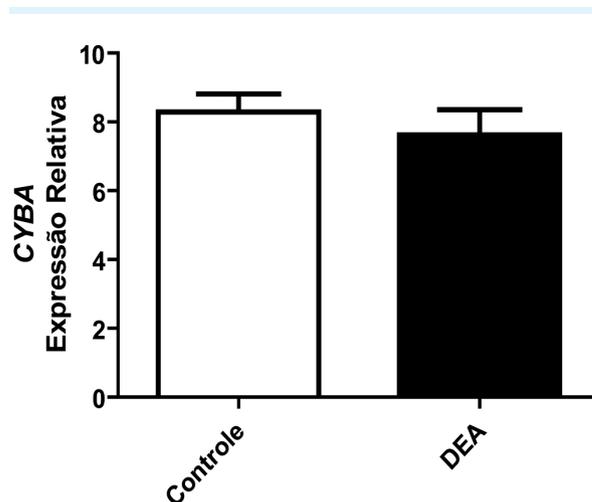


Figura 3: Expressão relativa do gene *CYBA* por real-time PCR

A expressão de *CYBA* (p22^{phox}) em células B-EBV transformadas de pacientes com DEA foi semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$; Teste ANOVA).

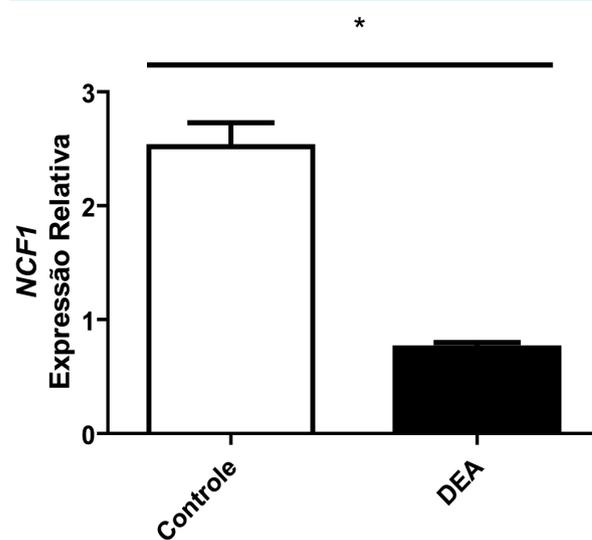


Figura 4: Expressão relativa do gene *NCF1* por real-time PCR

A expressão do gene *NCF1* (p47^{phox}) nas células B-EBV transformadas de pacientes com DEA foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Teste ANOVA).

Granulomatosa Crônica (DGC). Como não foram observados casos de infecções profundas, formação de granulomas ou micobacterioses, o fenótipo observado em pacientes com DEA se assemelha ao de pacientes com DGC autossômica recessiva⁷.

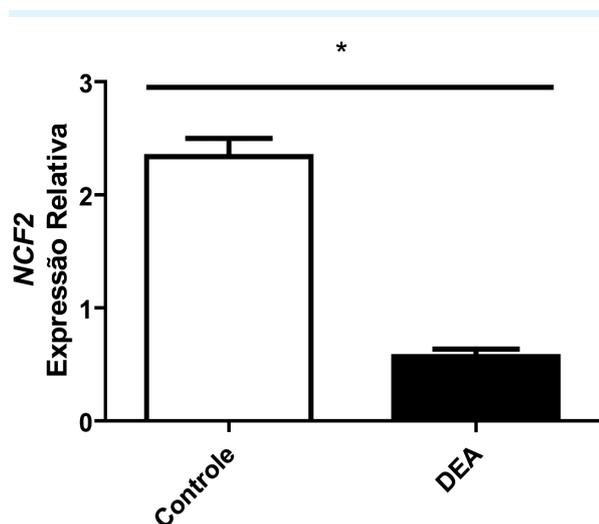


Figura 5: Expressão relativa do gene *NCF2* por real-time PCR.

A expressão do gene *NCF2* (p67^{phox}) nas células B-EBV transformadas de pacientes com DEA foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Teste ANOVA).

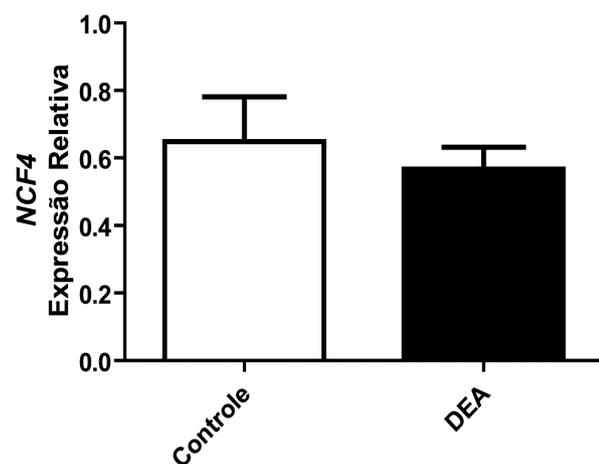


Figura 6: Expressão relativa do gene *NCF4* por real-time PCR

A expressão do gene *NCF4* (p40^{phox}) nas células B-EBV transformadas de pacientes com DEA foi semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$; Teste ANOVA).

A DGC ligada ao cromossomo X é uma enfermidade que acomete $1/2,5 \times 10^5$ indivíduos que apresentam mutação do gene *CYBB*, que codifica a cadeia pesada do citocromo *b₅₅₈* ou gp91^{phox}. Nas formas autossômicas recessivas da DGC

podem ser afetados os genes dos componentes citosólicos do sistema NADPH oxidase, *NCF1* (proteína adaptadora p47^{phox}), *NCF2* (proteína ativadora p67^{phox}); *CYBA* (p22^{phox}, a cadeia leve do citocromo *b₅₅₈*), e *NCF4* (p40^{phox})¹⁵.

Pacientes com DGC ligada ao cromossomo X apresentam infecções graves desde o primeiro ano de vida, e pacientes com a forma autossômica recessiva tendem a apresentar quadro clínico menos grave, com início tardio dos sintomas. Vacinas contendo bactérias atenuadas, como a BCG, são contraindicadas devido ao risco de reações adversas graves¹⁶.

Células B EBV transformadas mimetizam desordens genéticas da NADPH oxidase¹⁷, e proveem um modelo útil para a avaliação destas desordens moleculares, o que levou a adoção desse modelo.

Os pacientes em estudo apresentaram baixo burst oxidativo, avaliado através do teste de redução do NBT. Nesta técnica, o sal solúvel amarelo oxidado no interior dos leucócitos é reduzido a formazam azul escuro insolúvel. Valores baixos do teste de NBT são observados na terapia imunossupressora, corticoterapia, DGC, deficiência de mieloperoxidase e G6PD, lúpus eritematoso sistêmico e anemia falciforme¹⁸. Contudo, esse teste qualitativo apresenta resultados falso positivos e falso negativos, ou é capaz de determinar alterações discretas na produção de espécies reativas do oxigênio¹⁹.

Para evitar esses problemas foi utilizada a técnica de determinação dos níveis de ânion superóxido baseada na redução do citocromo c, avaliado em espectrofotometria por meio da redução do citocromo c inibida especificamente pela superóxido dismutase. Esse método quantitativo de alta sensibilidade e especificidade é utilizado no diagnóstico das diferentes formas hipomórficas da DGC¹³.

A partir da imortalização das células B foi verificado que a quantidade de ânion superóxido em pacientes com DEA que se assemelhou ao observado em pacientes com DGC autossômica recessiva²⁰. Defeitos nos componentes da ativação do NF- κ B podem resultar em fenótipos

distintos de imunodeficiências, que podem mimetizar a DEA²¹.

Estes resultados estão de acordo com os descritos em modelo murino, onde foi observada perda na atividade da NADPH oxidase em leucócitos, fibroblastos e células neuronais depois da super expressão de I κ B α ou em nocautes para p65/RelA²².

Em células hematopoiéticas, a expressão do gene *CYBB* é restrita à série mieloide, em sua etapa de diferenciação terminal⁵. Contudo, a expressão dos genes do sistema NADPH oxidase é bastante sensível a citocinas como o IFN-gama²³, o que fez com que esta citocina fosse utilizada neste estudo para avaliação da expressão gênica dos componentes do sistema NADPH oxidase. O resultado final dessa expressão gênica é a produção de espécies reativas do oxigênio.

A expressão gênica refere-se ao processo na qual as informações codificadas por um determinado gene são decodificadas em uma proteína. A quantidade de expressão de um gene em uma célula pode ser mensurado pelo número de cópias de um transcrito de RNA mensageiro de um determinado gene presente em uma amostra, através da técnica de RT-PCR.

Foi verificada alteração na expressão gênica de *NCF1* e *NCF2* em células B-EBV de pacientes com DEA após estimulação com IFN-gama. O gene *NCF1* codifica a proteína adaptadora p47^{phox}, crítica para o aumento da atividade da NADPH oxidase²⁴. A ausência da proteína p47^{phox} em modelo murino diminui a ativação do NF- κ B e a capacidade de defesa contra *Pseudomonas sp.*²⁵, e sua ausência em pacientes com DGC favorece o surgimento de uma série de infecções oportunistas²⁰. Diminuição da expressão gênica de *NCF1* foi descrita em células B-EBV transformadas de um paciente com DEA e outro com defeito no eixo IL-12/23-IFN- γ , ambos com histórico de infecções recorrentes²⁶. As infecções estafilocócicas, comuns em pacientes com DGC e DEA podem refletir em parte uma diminuição do burst oxidativo dos leucócitos. Contudo, diferenças fenotípicas ocorrem na natureza, uma vez que o NF- κ B é um fator de transcrição ubíquo

envolvido na expressão de genes relacionados a imunidade inata e adaptativa²⁷.

O gene *NCF2* codifica a proteína ativadora p67^{phox}, que juntamente com p47^{phox} e p40^{phox}, formam um complexo no citosol que se transloca com Rac-GTP até a membrana, e a união física de p67^{phox} e gp91^{phox} forma o domínio catalítico responsável pela ativação do sistema NADPH oxidase¹⁵. Mutações do *NCF2* em pacientes com DGC autossômica, apresentam menor gravidade da doença e maior probabilidade de sobrevivência²⁸.

Conclusão

Foi verificado que o NF- κ B é necessário para a expressão dos genes *NCF1* e *NCF2*, atividade do sistema NADPH oxidase e produção de ânion superóxido em pacientes com DEA, o que justifica o aumento da susceptibilidade a infecções recorrentes do trato respiratório e digestório.

Referências

1. Ross D. Chronic granulomatous disease. *Br Med Bull.* 2016;118(1):50-63.
2. Tarazona-Santos E, Machado M, Magalhães WC, Chen R, Lyon F, et al. Evolutionary dynamics of the human NADPH oxidase genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF2*, and *NCF4*: functional implications. *Mol Biol Evol.* 2013;30(9):2157-67.
3. Conway KL, Goel G, Sokol H, Manocha M, Mizoguchi E, et al. p40phox expression regulates neutrophil recruitment and function during the resolution phase of intestinal inflammation. *J Immunol.* 2012;189(7):3631-40.
4. Lorincz AM, Szarvas G, Smith SM, Ligeti E. Role of RAc GTPase activating proteins in regulation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Free Radic Biol Med.* 2014;68:65-71.
5. O'Neill S, Brault J, Stasia MJ, Knaus UG. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol.* 2015; 6: 135-56.
6. Stasia MJ. *CYBA* encoding p22(phox), the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology. *Gene.* 2016;586(1):27-35.

7. Ranjan R, Lee YG, Karpurapu M, Syed MA, Chung S, Deng J, et al. p47phox and reactive species production modulate expression of microRNA-451 in macrophages. *Free Radic Res.* 2015;49(1):25-34.
8. Chessa TA, Anderson KE, Hu Y, Xu Q, Rausch O, et al. Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an importante physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood.* 2010;116(26):6027-36.
9. Jimi E, Fukushima H. NF- κ B signaling pathways and the future perspectives of bone disease therapy using selective inhibitors of NF- κ B. *Clin Clacium.* 2016;26(2):298-304.
10. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FESBS J.* 2016;283(3):413-24.
11. Kawai T, Nishikomori R, Heike T. Diagnosis and treatment in anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Allergol Int.* 2012;61(2):207-17.
12. Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood.* 2000;95(11):3548-54.
13. Condino-Neto A, Muscará MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandão AC, Grumach AS, et al. Effect of Therapy with Recombinant Human Interferon- γ on the Release of Nitric Oxide by Neutrophils and Mononuclear Cells from Patients with Chronic Granulomatous Disease. *J Interferon Cytokine Res.* 1996;16(5):357-64.
14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
15. Chiriaco M, Salfa I, Di Matteo G, Rossi P, Finocchi A. Chronic granulomatous disease: clinical, molecular, and therapeutic aspects. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27(3):242-53.
16. Delibalta G, Seringec M, Oncul O. A case diagnosed with chronic granulomatous disease after disseminated infection following BCG vaccination. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(3):461-6.
17. Volkman DJ, Buescher ES, Gallin JI, Fauci AS. B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome. *J Immunol.* 1984;133(6):3006-9.
18. Roxo Júnior P. Primary immunodeficiency diseases: relevant aspects for pulmonologists. *J Bras Pneumol.* 2009;35(10):1008-17.
19. Ochs HD, Igo RP. The NBT slide test: a simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers. *J Pediatr.* 1973;83(1):77-82.
20. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013;27(1): 89-99.
21. Bustamante J, Picard C, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Genetic lessons learned from X-linked Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1246:92-101.
22. Anrather J, Racchumi G, Ladecola C. NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem.* 2006;281(9):5657-67.
23. Errante PR, Frazão JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2008;3(3):225-30.
24. Liu W, Wu H, Chen L, Wen Y, Kong X, Gao WQ. Park7 interacts with p47(phox) to direct NADPH oxidase-dependent ROS production and protect against sepsis. *Cell Res.* 2015;25(6):691-706.
25. Sadikot RT, Zeng H, Yull FE, Li B, Cheng D, Kernodle DS, et al. p47phox deficiency impairs NF- κ B activation and host defense in *Pseudomonas pneumonia*. *J Immunol.* 2004;172(3):1801-8.
26. Aragão-Filho WC, Moreira J, Oliveira-Júnior EB de, Rehder J, Bustamante J, Casanova J-L, et al. 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 . *Rev Bras Alerg Imunopatol.* 2009;32(2):48-53.
27. D'Assante R, Fusco A, Palamaro L, Giardino G, Gallo V, Cirillo E, Pignata C. Unravelling the link between ectodermal disorders and primary immunodeficiencies. *Int Rev Immunol.* 2016;35(1): 25-38.
28. Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 2010;363(27):2600-10.

