



# DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA DA INFÂNCIA: NOVOS POLIMORFISMOS NO GENE NCF2

## *CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE OF CHILDHOOD: NEW POLYMORPHISMS IN NCF2 GENE*

Lina Andrea GÓMEZ<sup>1</sup>  
Maria Teresa RUGELES<sup>2</sup>  
Pablo Javier PATIÑO<sup>2</sup>  
Antonio CONDINO-NETO<sup>3</sup>

### RESUMO

#### **Objetivos**

Mutações no gene NCF2 resultam na forma autossômica recessiva da doença granulomatosa crônica da infância. Além de mutações conhecidas, descreveu-se em pacientes com doença granulomatosa crônica da infância duas novas substituições no gene NCF2. O objetivo deste estudo foi investigar se estas substituições constituem polimorfismos do gene NCF2.

<sup>1</sup> Doutoranda, Faculdade de Ciências Médicas, Centro de Investigação em Pediatria, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. *E-mail:* lgomez@fcm.unicamp.br

<sup>2</sup> Laboratório de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Antioquia, Medellín, Colômbia. *E-mails:* mtrugel@catios.udea.edu.co; ppatino@catios.udea.edu.co

<sup>3</sup> Departamento de Pediatria, Centro de Investigação em Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Caixa Postal 6111, 13081-970, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/*Correspondence to:* A. CONDINO-NETO. *E-mails:* condino@lexxa.com.br; condino@unicamp.br, Suporte Financeiro; FAPESP, Processos 01/14365-3 e 02/05880-4.

## Métodos

Investigamos a frequência de duas substituições na sequência do gene NCF2 em 214 doadores sadios. A primeira é uma transição de C→T na posição -23 da região 5' reguladora. A segunda é uma transição de A→G na posição -21 da região 3' terminal do íntron 10. Extraímos DNA genômico de células do sangue periférico. O DNA foi amplificado por meio de PCR com primers específicos para o gene NCF2, analisado quanto à presença de polimorfismos conformacionais de cadeias simples, digerido com endonucleases específicas e sequenciado. O cálculo das frequências genotípicas e alélicas seguiu a lei de Hardy e Weinberg.

## Resultados

Cem indivíduos foram avaliados quanto à presença da transição C→T na posição -23 da região 5' reguladora; sendo 67% homocigotos para o alelo C, 32% heterocigotos, e apenas 1% homocigoto para T. Cento e quatorze indivíduos foram analisados quanto à presença da transição A→G na posição -21 da região 3' terminal do íntron 10; dos quais 36% foram homocigotos para A, 43% heterocigotos e 21% homocigotos para G.

## Conclusão

Considerando as frequências alélicas, concluímos que essas variantes correspondem a polimorfismos do gene NCF2. Suas possíveis implicações na expressão do gene NCF2 constituem objeto de pesquisa atual em nosso laboratório.

**Termos de Indexação:** imunodeficiências primárias, distúrbios fagocitários, criança, infecções de repetição.

## ABSTRACT

### Objectives

*Mutations in the NCF2 gene result in an autosomal recessive form of chronic granulomatous disease of childhood. We have recently described nucleotide changes in p67-phox-deficient chronic granulomatous disease of childhood in patients that apparently were not responsible for their chronic granulomatous disease of childhood phenotype. To determine if two of these changes are genetic polymorphisms, we analyzed their occurrence in the general population.*

### Methods

*We investigated the frequency of two substitutions in NCF2 gene in 214 healthy individuals. The first corresponded to a C→T transition at position -23 of the 5' regulatory region of the gene. The second corresponded to an A→G transition in position -21 of the 3' end of intron 10 (IVS10-21A→G). NCF2 gene fragments from genomic DNA were amplified by PCR with specific primers. These substitutions were detected in genomic DNA by conformational polymorphism analysis of PCR-generated fragments, restriction endonuclease digestion assays,*

and DNA sequencing. Genotypes and allelic frequencies were calculated by the Hardy-Weinberg law equation.

### Results

A total of 100 healthy subjects were analyzed for the presence of the C→T transition of the 5' regulatory region of the gene, 67% were homozygous for C, 32% were heterozygous, and 1% was homozygous for T. The A→G transition in intron 10 was analyzed in 114 subjects, 36% were homozygous for A, 43% were heterozygous, and 21% were homozygous for G.

### Conclusion

Considering the allelic frequencies, we conclude that both substitutions correspond to polymorphisms of NCF2 gene. The possible implications for transcription or expression of NCF2 gene are under current investigation in our laboratory.

**Index terms:** primary immunodeficiencies, phagocytes disorders, child, recurrent infections.

## INTRODUÇÃO

As células fagocíticas têm um papel fundamental na defesa inata do hospedeiro contra as infecções. Para esta função, os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos possuem um eficiente sistema microbicida dependente do oxigênio, cuja atividade é conhecida como explosão respiratória dos fagócitos<sup>1</sup>. A produção de reativos intermediários do oxigênio (ROS) ocorre como consequência da ativação de um complexo enzimático denominado NADPH oxidase, que está localizado principalmente na membrana fagolisossomal. Esse sistema transfere os elétrons do NADPH citosólico para o vacúolo, com a finalidade de reduzir o oxigênio a ânion superóxido, dando início aos eventos que levam a morte dos patógenos.<sup>2</sup>

O centro enzimático do complexo NADPH oxidase é constituído por vários elementos. A glicoproteína de 91 KDa (gp91-*phox*) e a proteína de 22 KDa (p22-*phox*) formam um heterodímero denominado flavocitocromo b<sub>558</sub>, presente na membrana das células fagocíticas<sup>3</sup>. As proteínas de localização citosólica são a p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox*, as quais se transladam para a membrana quando os fagócitos são ativados<sup>1</sup>. Um defeito na

proteína gp91-, p22-, p47- ou p67-*phox* produz a Doença Granulomatosa Crônica da infância (DGC), uma imunodeficiência primária caracterizada por infecções graves e recorrentes causadas principalmente por bactérias catalase positiva e fungos<sup>4</sup>.

Além dessas mutações associadas com a DGC, são encontradas diversas substituições nos genes do sistema oxidase, algumas delas consideradas polimorfismos, pois sua frequência na população geral é mais elevada do que se esperaria apenas pela taxa de mutação recorrente<sup>5</sup>. No gene da p67-*phox* foram descritas várias mutações responsáveis pela DGC, em várias regiões da seqüência deste gene.<sup>6,7</sup> Recentemente foram encontradas algumas substituições não descritas previamente, durante a caracterização de pacientes com DGC, secundária a deficiência de p67-*phox*, os quais além das mutações responsáveis pelo fenótipo de DGC, apresentavam diferentes substituições de nucleotídeos, que também foram identificadas em indivíduos saudáveis, e que por sua localização na estrutura do gene, poderiam modificar parcialmente a expressão do mesmo<sup>8</sup>. Uma destas alterações corresponde à transição de C→T na posição -23 da região 5' reguladora do gene, que pode ter importância na regulação do promotor do gene<sup>9</sup>. A

outra substituição é uma transição de A→G no íntron 10, na posição de 21 nucleotídeos antecedendo o início do éxon 11 (IVS10-21 A→G), local de importância para o *splicing* da molécula e processamento do RNA maduro<sup>10</sup>. O objetivo deste trabalho foi investigar a frequência destas variações alélicas na população geral, e determinar se estas constituem polimorfismos do gene NCF2.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 214 indivíduos não relacionados, voluntários sadios da população geral, de ambos os sexos, com idades entre 18 e 40 anos. Após leitura e concordância com os termos do Consentimento Livre e Esclarecido foi realizada uma pequena entrevista inicial sobre seu estado de saúde e o registro de episódios infecciosos mais importantes. A seguir, foram coletados 10mL de sangue venoso periférico em tubos com heparina. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, em conformidade com a resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde do Brasil.

### Obtenção de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído do sangue venoso periférico, utilizando-se o *kit DNA Purification* (Promega, Madison, WI), segundo as instruções do fabricante. O DNA foi ressuspenso em 100µl de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) e armazenado a 4°C até seu uso.

### Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)

As zonas do DNA genômico correspondentes à região 5' reguladora do gene NCF2 e ao extremo 3' do íntron 10 do mesmo gene foram amplificadas a partir do DNA genômico obtido dos indivíduos sadios. Os oligonucleotídeos usados para a região 5'

foram: p67-5'LB 5'ACCTCTGGCTGGTGACAC3' e p67-EX1RB 5'CCTCCCTGGTGATAATGACA3'; enquanto que para o íntron 11 foram p67-Ex11LA 5'GTGTTTCCCCACATCCAC3' e p67-Ex11RA 5'CAGGGAGAGGAACTCAGGA3'.

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 50 µl utilizando *Amplitaq Gold* (Perkin Elmer). As condições da reação de amplificação foram de 30 ciclos de 96°C/2min, 63°C/15seg e 72°C/30seg, seguidos de um ciclo de extensão de 72°C por 7 minutos, o qual foi realizado num termociclador Gen<sup>®</sup> PCR *Sistem 9600* (Perkin Elmer). Com a finalidade de confirmar a amplificação, os fragmentos foram visualizados por meio de luz ultravioleta, depois sua separação por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

### Análises de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP)

Com a finalidade de identificar polimorfismos conformacionais nos fragmentos de amplificação correspondente à região 5' do gene NCF2 (oligonucleotídeos p67-5'LB e p67-EX1RB) e ao extremo 3' do íntron 10 (oligonucleotídeos p67-Ex11LA e p67-Ex11RB), os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em condições nativas utilizando uma câmara de seqüenciamento. Para isso misturou-se 5µl da reação de PCR com azul de bromofenol dissolvido em formamida, o DNA foi desnaturado por 2min a 80°C, em seguida foi colocado sobre um gel de poliacrilamida a 6% e foi corrida uma eletroforese a 35 Watts por 3 horas. A seguir, o gel foi corado com uma solução de prata seguindo protocolo previamente descrito<sup>11</sup>.

### Identificação do polimorfismo na posição -23 da região 5'

O fragmento de DNA obtido depois da amplificação da região 5' do gene NCF2 foi digerido com a enzima de restrição Mae III, 2U/µl (Boehringer Mannheim), a 55°C durante 3 horas, em um volume final de 25µl, em tampão específico

(20mM Tris-HCL, 275mM NaCL, 6mM MgCL<sub>2</sub>, 7mM 2-mercaptoetanol, pH 8.2). Esta enzima reconhece e corta no sítio GTNAC, onde N significa qualquer nucleotídeo. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose NuSieve (FMC BioProducts, Rockland, Maine) a 2,5%. O gel foi corado com brometo de etídio (1µg/ml), e as bandas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta.

### Seqüenciamento enzimático do DNA

As amostras de DNA amplificadas por PCR foram purificadas utilizando o *Concert Rapid PCR Purification System* (Life Technologies, Gibco) e seqüenciadas pelo método enzimático de incorporação de dideoxynucleotídeos, utilizando o *kit DNA sequencing Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction for ABI 377* (PE/Applied Biosystems). Quando indicado, o fragmento foi subclonado no vetor pBlueScript conforme ensaios padronizados<sup>12</sup>. Uma vez obtidas as seqüências alteradas, estas foram comparadas com as seqüências normais a partir dos dados do *GenBank*.

### Estatística

As freqüências dos polimorfismos foram determinadas a partir das leis de Hardy-Weinberg, que são uma extensão das leis Mendelianas e descrevem as freqüências de alelos e de genótipos para populações em equilíbrio gênico. A lei de Hardy e Weinberg estabelece que  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , onde p= freqüência do alelo dominante e q= freqüência do alelo recessivo<sup>13</sup>.

## RESULTADOS

### Transição de C por T na posição -23 da região promotora do gene NCF2

Para determinar a freqüência desta substituição, o fragmento de 465 pb que inclui a região 5'

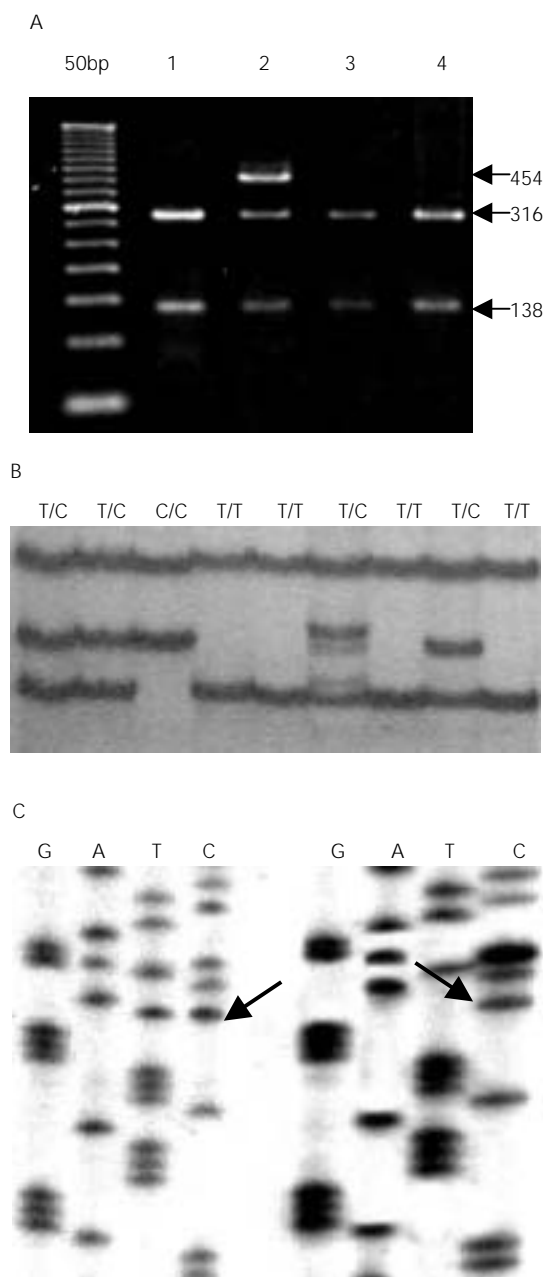
promotora do gene, foi obtido do DNA genômico amplificado por meio de PCR, de 100 indivíduos sadios. Esse fragmento foi digerido com a enzima de restrição Mae III, que corta a citosina na posição -23. A Figura 1A mostra o padrão de digestão deste fragmento nos diferentes indivíduos. Os homocigotos para o alelo C geraram fragmentos de 138pb e 316pb, os heterocigotos (C/T) geraram fragmentos de 138, 316 e 454pb.

Embora os indivíduos homocigotos para o alelo referido (C/C) pudessem gerar três fragmentos (316pb, 138pb e 11pb), somente dois deles são visíveis, pois o terceiro é muito pequeno para ser observado. Os indivíduos homocigotos para o novo alelo (T/T) devem gerar dois fragmentos (454pb e 11pb) e os heterocigotos podem apresentar os 4 possíveis fragmentos.

A análise SSCP do produto de PCR revelou diferentes padrões eletroforéticos para cada genótipo (Figura 1B). Cada produto de amplificação é desnaturado, migra nas suas condições nativas, permitindo observar três bandas nos indivíduos heterocigotos e apenas duas nos homocigotos. Para confirmar esses resultados, seqüenciamos a região que contém a substituição (Figura 1C). Sessenta e sete dos 100 sujeitos foram homocigotos para C, 32 foram heterocigotos, e somente um deles foi homocigoto para T (Tabela 1).

**Tabela 1.** Freqüências fenotípicas e alélicas dos polimorfismos -23C•T e IVS10-21A•G, calculadas por meio da lei de Hardy-Weinberg.

|                         | 5'-23C•T       |            | IVS10-21A•G    |             |
|-------------------------|----------------|------------|----------------|-------------|
| Freqüências genotípicas | n (freqüência) |            | n (freqüência) |             |
|                         | C/C            | 67 (0,67)  | A/A            | 41 (0,36)   |
|                         | C/T            | 32 (0,32)  | A/G            | 49 (0,43)   |
|                         | T/T            | 1 (0,01)   | G/G            | 24 (0,21)   |
| Freqüências alélicas    | C              | 163 (0,83) | A              | 131 (0,575) |
|                         | T              | 33 (0,17)  | G              | 97 (0,425)  |



**Figura 1.** Transição de C por T na posição -23 da região promotora do gene NCF2.

**Painel A.** Eletroforese dos fragmentos de PCR da região 5' do gene NCF2 digeridos com Mae III. As linhas 1, 3 e 4 mostram o padrão de digestão dos homozigotos para C na posição -23. A linha 2 mostra o heterozigoto (C/T).

**Painel B.** Análise de SSCP dos fragmentos de PCR da região 5' do gene NCF2 em 9 indivíduos estudados. A concordância desses padrões de migração com os diferentes genótipos na posição -23 do promotor foi confirmada pela digestão com Mae III e seqüenciamento do DNA.

**Painel C.** Seqüência de DNA da região 5' do gene NCF2 de indivíduos apresentando diferentes genótipos. As setas indicam os nucleotídeos presentes na posição -23.

## Transição de A por G na posição -21 do íntron 10 (IVS10-21A→G) no gene NCF-2

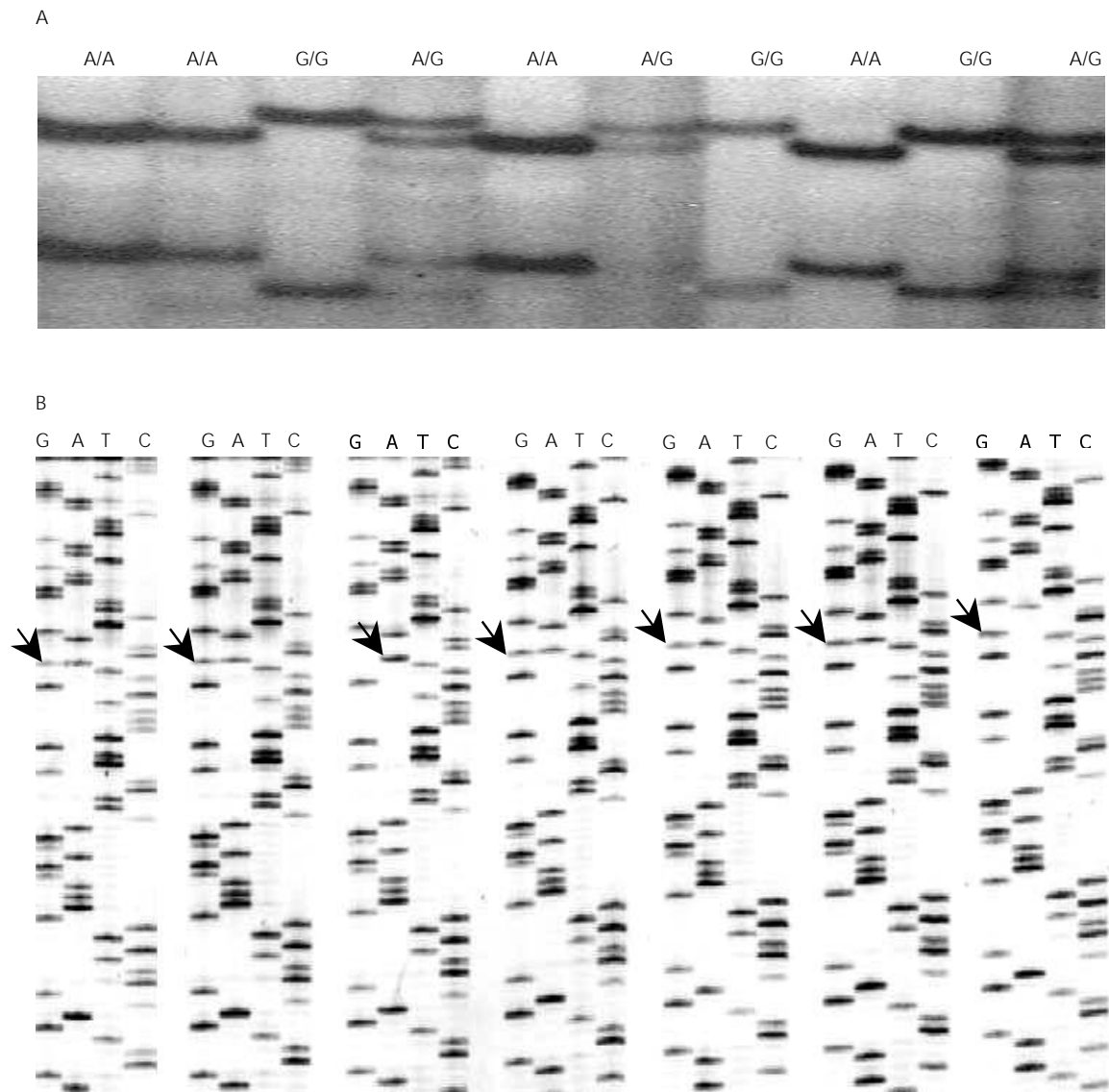
O ensaio SSCP usando um fragmento de PCR de 200pb contendo o final 3' do íntron 10 foi realizado para identificar a substituição de A por G na posição -21 do íntron 10, já que não achamos uma enzima de restrição para a identificação da substituição.

Observamos um padrão de quatro bandas para os indivíduos heterozigotos (G/A), e duas bandas para os homozigotos (A/A) ou (G/G) (Figura 2A). Essa substituição nucleotídea foi confirmada por seqüenciamento, usando o método enzimático de incorporação de dideoxynucleotídeos como mencionado nos materiais e métodos (Figura 2B). Uma completa correlação entre o seqüenciamento e os dados da migração do SSCP foi observada. Dos 114 sujeitos analisados para essa transição nucleotídea, 41% foram homozigotos para A, 49% foram heterozigotos e 24% foram homozigotos para G (Tabela 1).

## DISCUSSÃO

Somente 2% a 3% do DNA humano se expressa. Assim, o maior parte do genoma humano não é composto por genes que transcrevem um RNA importante para a produção de uma proteína fundamental. Mutações neste DNA não chegam a ter um efeito no fenótipo do indivíduo e por este motivo não são eliminadas da população. Em outras palavras, o DNA que não é transcrito está mais sujeito a acumular mutações, constituindo uma grande fonte de variabilidade no DNA dos indivíduos. Estas variações genéticas sem conseqüências aparentes, precisam ser diferenciadas daquelas que causam o aparecimento de doenças genéticas, por afetarem regiões importantes de genes fundamentais para o indivíduo<sup>14</sup>.

O objetivo deste trabalho foi determinar a freqüência de duas substituições de nucleotídeos localizadas em regiões não transcritas do gene NCF2. Estas regiões são importantes para o começo da



**Figura 2.** Transição de A por G na posição -21 do íntron 10 (IVS10-21A®G) no gene NCF-2.

**Painel A.** Análise por SSCP da região do íntron 10-exon 11 do gene NCF2 de 10 indivíduos sadios. Esse Padrão de migração concorda com os diferentes genótipos na posição -21 do íntron 10, identificados por sequenciamento do DNA.

**Painel B.** Sequência do DNA da região do íntron 10-exon 11 do gene NCF2. As setas indicam os nucleotídeos presentes na posição -21 do íntron 10.

transcrição gênica (região 5' reguladora) ou para o *splicing* do RNA (seqüência receptora do íntron 10), e portanto, uma variação nessa seqüência pode resultar numa alteração da expressão gênica, reduzindo a síntese da p67-*phox* e conseqüente diminuição da atividade microbicida das células fagocíticas.

A transição na posição -23 na região 5' do gene NCF2 foi detectada na maioria dos indivíduos sadios estudados com uma freqüência alélica de 17% para o alelo T, o que corresponde a um polimorfismo no gene NCF2. Embora outros polimorfismos tenham sido descritos neste gene<sup>6</sup>, a mudança -23C.T é a primeira a ser descrita na região promotora do gene

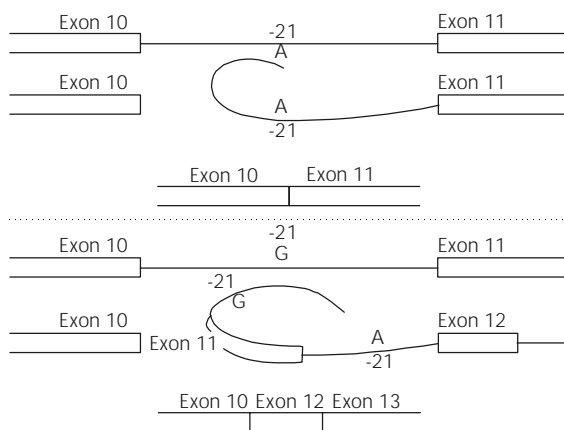
NCF2, e pode ter implicações para o início de sua transcrição.

A eficiência da transcrição está sujeita a regulação por proteínas ativadoras ou supressoras da transcrição. Sugere-se que os fatores de transcrição unidos ao DNA influenciam a transcrição por meio de interação proteína-proteína, com fatores de iniciação geral, resultando na potencialização do recrutamento ou estabilização do complexo do promotor basal ao molde. Um desses ativadores é o Sp1, que se liga às chamadas caixas GC. O Sp1 é universalmente expresso, sendo necessário para a expressão constitutiva e induzível de uma variedade de genes. Outros fatores de transcrição descritos no promotor do gene NCF2 incluem o Sp1/Sp3, PU.1, AP-1, PU.1/HAF1, importantes para a atividade do promotor<sup>9,15</sup>. Embora o polimorfismo aqui apresentado não esteja localizado em nenhuma seqüência reguladora conhecida do promotor do gene NCF2, sua proximidade ao sítio de início de transcrição, sugere que este possa alterar a expressão do RNA.

Também foi investigada a frequência alélica de uma segunda mudança substituição, a transição de A por G na posição -21 (*IVS10-21A*→*G*) no gene NCF2. Esta alteração pode modificar o *splicing* do exon 11 neste gene<sup>8</sup>. A substituição -21A foi encontrada na *branch acceptor sequence* do íntron 10, o qual é necessário para a formação do laço entre a extremo 5' livre e o extremo 3' terminal do íntron<sup>16,17</sup>.

Durante o *splicing* do RNAm, o sítio doador no extremo 5' do íntron é cortado por ribonucleoproteínas que constituem o esplaisossomo, gerando um exon com um extremo 3' livre e um íntron com uma guanina livre no extremo 5'. O grupo fosfato desta guanina livre é esterificado com um grupo hidroxila de uma adenina conservada, localizada na seqüência *branch acceptor*, entre os nucleotídeos -18 e -37 do extremo 3' do íntron. Estes acontecimentos permitem a formação do laço e o corte do extremo 3' do íntron. Simultaneamente com a excisão do íntron, ambos os exons são unidos e a seqüência do íntron é removida<sup>16</sup>.

A substituição descrita no íntron 10, pode alterar o *splicing* do RNA do gene NCF2 no íntron 10 e no exon 12. Em alguns casos o *splicing* normal está presente, pois o extremo 5' no íntron 10 reconhece o sítio aceptor de *splicing* no mesmo íntron. Entretanto, em outras circunstâncias, a formação do laço ocorre entre o extremo 5' do íntron 10 e a seqüência aceptor de *splicing* no íntron 11, a qual resulta em exclusão do exon 11. A eliminação deste exon pode mudar o marco de leitura e resultar em uma proteína truncada (Figura 3).



**Figura 3. Splicing Alternativo.** A transição de A por G na posição -21 do íntron 10 (*IVS10-21A*→*G*) no gene NCF-2 pode modificar parcialmente o *splicing* do exon 11 neste gene (8). A posição -21 está localizada na seqüência *branch acceptor* do íntron 10, que é necessária para a formação do laço entre a região 5' e o extremo 3' do íntron 10.

No grupo de indivíduos sadios analisados para essa transição, 36% foram homocigotos para A, 21% foram homocigotos para G, e o restante foi heterocigoto. Estes dados indicaram uma frequência alélica para G de 42,5%. Como este alelo está presente em quase metade da população sadia, pode ter um papel importante na expressão da *p67-phox*.

Estudos preliminares de nosso grupo indicam que algumas espécies de RNAm não possuem o exon 11<sup>18</sup>. A redução de moléculas de RNAm normais em células que carregam um dos polimorfismos que descrevemos pode diminuir a expressão da *p67-phox*. Entretanto, na maioria dos casos, a redução do



número de moléculas de RNAm pode não alterar a função do sistema NADPH oxidase, já que um número reduzido de moléculas de *p67-phox* é suficiente para a ativação completa e normal deste sistema. Porém, estes polimorfismos podem ser deletérios se presentes simultaneamente com mutações no gene, afetando drasticamente a expressão ou a função da proteína *p67-phox* ou de outros genes envolvidos na resposta imune. Além disso, efeitos adicionais ou diferentes destes, podem ser causados por polimorfismos, conduzindo a uma resposta imune anormal em indivíduos normais. Em pacientes que já apresentam resposta imune defeituosa, os efeitos sinérgicos poderiam ser ainda piores<sup>19,20</sup>.

Considerando as freqüências alélicas observadas nesta pesquisa, concluímos que essas variantes constituem polimorfismos do gene *NCF2*. Suas possíveis implicações sobre a expressão do gene *NCF2*, funcionamento da proteína *p67-phox*, por ele codificada, atividade do sistema NADPH oxidase, por ela integrado, e conseqüentemente sobre a resposta imunológica, constituem objeto de pesquisa atual em nosso laboratório.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Jussara Rehder e Diana Castaño pela assistência técnica.

#### REFERÊNCIAS

1. Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994; 269(40):24519-22.
2. Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 67(3 Pt 2):S2-15.
3. Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 1991; 77(4):673-86.
4. Ezekowitz RA. Update on chronic granulomatous disease: the concept of the near-normal host. *Curr Clin Top Infect Dis* 2000; 20:325-34.
5. Lewin B. *Genes*. 5th ed. Oxford: Oxford University; 1994.
6. Aoshima M, Nunoi H, Shimazu M, Shimizu S, Tatsuzawa O, Kenney RT, *et al*. Two-exon skipping due to a point mutation in *p67-phox*-deficient chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 88(5):1841-5.
7. Tanugi-Cholley LC, Issartel JP, Lunardi J, Freycon F, Morel F, Vignais PV. A mutation located at the 5' splice junction sequence of intron 3 in the *p67phox* gene causes the lack of *p67phox* mRNA in a patient with chronic granulomatous disease. *Blood* 1995; 85(1):242-9.
8. Patino PJ, Rae J, Noack D, Erickson R, Ding J, de Olarte DG, *et al*. Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component *p67-phox*. *Blood* 1999; 94(7):2505-14.
9. Eklund EA, Jalava A, Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase *gp91(phox)* expression. *J Biol Chem* 1998; 273(22):13957-65.
10. Hornig H, Aebi M, Weissmann C. Effect of mutations at the lariat branch acceptor site on beta-globin pre-mRNA *splicing in vitro*. *Nature* 1986; 324(6097):589-91.
11. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5(4):874-9.
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. Monje S. Genética. Barcelona: Omega; 1982.
14. Bento S. DNA: segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier; 1997.
15. Lania L, Majello B, De Luca P. Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12):1313-23.
16. Krainer AR MT. RNA *splicing*. Washington DC: IRL Press; 1998.
17. Kuivenhoven JA, Weibusch H, Pritchard PH, Funke H, Benne R, Assmann G, *et al.* An intronic mutation in a lariat branchpoint sequence is a direct cause of an inherited human disorder (fish-eye disease). *J Clin Invest* 1996; 98(2):358-64.
18. Gómez LARM, Patino PJ, Condino-Neto A. A polymorphism in intron 10 of the NCF2 gene leading to alternative *splicing*. *In: Meeting of the Brazilian Society of Immunology 2003 Oct 5-8; Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Imunologia; 2003. p.153.*
19. Foster CB, Lehrnbecher T, Mol F, Steinberg SM, Venzon DJ, Walsh TJ, *et al.* Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1998; 102(12):2146-55.
20. Foster CB, Chanock SJ. Mining variations in genes of innate and phagocytic immunity: current status and future prospects. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(1):9-15.

Recebido e aceito para publicação em 14 de abril de 2004.