

EDGAR BORGES DE OLIVEIRA JÚNIOR

**UMA NOVA ABORDAGEM PARA O ESTUDO DOS
DEFEITOS GENÉTICO-MOLECULARES DA DOENÇA
GRANULOMATOSA CRÔNICA E ANÁLISE DE SUAS
RELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr Antonio Condino Neto

São Paulo
2010

RESUMO

Oliveira-Júnior EB. Uma nova abordagem para o estudo dos defeitos genético-moleculares da doença granulomatosa crônica e análise de suas relações genótipo-fenótipo. [Tese (Dourando em Imunologia)] São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A Doença Granulomatosa Crônica é uma imunodeficiência grave e rara, de manifestação precoce, na qual os quadros infecciosos por bactérias e fungos, ocorrem predominantemente nas barreiras naturais do organismo. O defeito molecular da DGC reside em mutações que afetam um dos componentes do sistema NADPH oxidase. Assim, na forma ligada ao sexo, é afetado o componente gp91-*phox*, ou NOX2 (56% dos casos), e nas formas autossômicas recessivas é afetado um dos componentes citosólicos, sendo a p47-*phox* a mais frequente (33% dos casos). A diversidade dessas mutações e os múltiplos genes afetados, explicam a heterogeneidade clínica e genética da DGC. A proposta deste trabalho foi identificar as alterações genético-moleculares de pacientes com DGC comparando dois métodos de triagem e avaliar a correlação genótipo-fenótipo das alterações encontradas. O método **dHPLC** mostrou-se mais sensível que o SSCP, sendo eficaz na detecção de alterações em **100%** dos casos. Identificamos sete mutações diferentes no gene *CYBB*, sendo quatro delas inéditas. Identificamos as mutações: **R226X** (exon 7); **R290X** (exon 8); e **C537R** (exon 13). Dentre as mutações inéditas identificamos: **T302fsX46** (exon 9); **c.141+5 G>T** (intron 2); **C185R** (exon 6); e **H222L** (exon 6). Em duas pacientes identificamos a mutação c. **V25fsX51** (exon 2) no gene *NCF1* na forma homozigota em duas pacientes. Estabelecemos uma correlação entre genótipo e fenótipo clínico por meio de cálculo matemático baseado em seleção e classificação de 18 manifestações clínicas mais relevantes e comuns entre estes pacientes, nos fornecendo dados importantes como pontos gerais de cada manifestação clínica e um Índice de Gravidade Clínica (**IGC**) para cada tipo de mutação envolvida na DGC (*CYBB* “nonsense”, *CYBB* “missense”, *CYBB* “splicing” e *NCF1* “nonsense”). Os resultados contribuem para o avanço do conhecimento sobre o sistema NADPH oxidase fagocítico humano, para a construção de estratégias que permitam a identificação dos defeitos genético-moleculares relacionados à DGC e, sobretudo no desenvolvimento e diferenciação clínica para cada tipo de mutação na DGC, podendo este modelo ser adaptado para o estudo de outras imunodeficiências.

Palavras-chave: DGC. Fagócitos. NADPH oxidase. *CYBB*. *NCF1*. dHPLC. Índice de Gravidade Clínica.

ABSTRACT

Oliveira-Júnior EB. A new approach to study of molecular-genetic defects of chronic granulomatous disease and analysis of its genotype-phenotype relationships. 2010. [Ph. D. Thesis (Immunology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Chronic granulomatous disease (CGD) is a primary immunodeficiency characterized by early onset of recurrent and severe infections, affecting the body barriers. In these patients, phagocytes present a failure in the respiratory burst characterized by the total absence or low levels of reactive oxygen species production caused by a deficiency of the NADPH oxidase system, and a severe microbicidal defect. Mutations affecting one of the components of the NADPH oxidase system lead to CGD. The most frequent is the X-linked form due to mutations in gp91phox (NOX2), encoded by *CYBB* gene. SSCP is a method for screening mutations widely used in investigating the *CYBB* gene, mostly in Latin America due to its low cost. dHPLC is a method that has been described and used for detection of mutations in PCR products by high-performance liquid chromatography under partially denaturing conditions. We compared the efficacy of dHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) and SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) for screening mutations in *CYBB* gene in 12 patients with X-linked chronic granulomatous disease (CGD). We found seven different mutations, four of which are original. Interestingly, the four novel mutations were identified only by dHPLC screening. Both methods detected the following alterations: R226X and R290X *CYBB* mutations. However, the novel mutations T302fsX46, 141 +5 G> T, C185R and H222L, were only detected by dHPLC. We concluded that dHPLC revealed high sensitivity and proved to be a reliable method for screening mutations and polymorphisms in an extensive gene and with a lot of genetic heterogeneity, as it happens in the *CYBB* gene. Moreover, we have identified mutations in *NCF1* gene in two patients (V25fsX5). We have established a correlation between clinical phenotype and genotype by means of mathematical calculation based on the selection and classification of 18 relevant clinical manifestations, indicating a Clinical Severity index (CSI) for each type of mutation involved in CGD (*CYBB* "nonsense", *CYBB* "missense", *CYBB* "splicing" and *NCF1* "nonsense"). We believe to be an innovative analysis conciliating clinical and molecular-genetics data. We propose to perfect this method and adopt it to study other immunodeficiencies.

Keywords: CGD. Phagocytes. NADPH oxidase. *CYBB*. *NCF1*. dHPLC. Clinical severity Index.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conceito e Classificação da Doença Granulomatosa Crônica (DGC)

A DGC (OMIM 306400) da infância foi descrita como uma entidade clínica em 1957, como uma enfermidade que acometia crianças do sexo masculino com pneumonia, linfadenite e abscessos localizados em diferentes áreas (Berendes et al., 1957; Landing e Shirkey, 1957; Bridges et al., 1959). 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* e bacilos gram-negativos, e fungos como *Aspergillus sp*, *Candida sp* e *Nocardia sp*, 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 alvos de infecções são: fígado, ossos, sistema nervoso central e pâncreas (Forrest et al., 1988; Segal et al., 2000; Winkelstein et al., 2000; Johnston, 2001; Movahedi et al., 2004; Agudelo-Florez et al., 2006; Oliveira-Júnior et al., 2010 – ANEXO A). Os reativos intermediários do oxigênio tiveram sua relevância clínica reconhecida, ao demonstrar-se que fagócitos de pacientes com DGC apresentam atividade microbicida defeituosa, resultado da baixa produção de superóxido, devido a mutações que afetam componentes do sistema NADPH oxidase (Holmes et al., 1966; Holmes et al., 1967; Babior, 2004; Holland, 2010), ilustrado na Figura 1.

O defeito molecular da DGC reside na ausência, baixa expressão ou mal funcionamento de um dos componentes do sistema NADPH oxidase. Assim, na forma ligada ao X, é afetada a cadeia pesada do citocromo *b₅₅₈*, o componente *gp91-phox*, também chamado de NOX2 (56% dos casos), e nas formas autossômicas recessivas é afetado um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, sendo a *p47-phox* ou *p67-phox* (respectivamente 33% e 5% dos casos); ou ainda a cadeia leve do citocromo *b₅₅₈*, o componente *p22-phox* (6% dos casos) (Parkos et al., 1988; Clark et al., 1989; Dinauer et al., 1990; Segal et al., 2000; Segal et al., 2000; Stasia e Li, 2008). Uma mutação foi descrita em um paciente com DGC secundária a defeito no componente *rac2* (Johnston, 2001), e recentemente foi descrita uma mutação na *p40-phox* resultando em defeito no “burst” oxidativo (Matute et al., 2009). Com base nestes achados, a classificação atual da DGC baseia-se nos defeitos moleculares específicos (Curnutte, 1988; Curnutte et al., 1994; Rae et

al., 1998; Segal e Holland, 2000; Segal et al., 2000; Winkelstein et al., 2000; Heyworth et al., 2003; Babior, 2004; Stasia e Li, 2008).

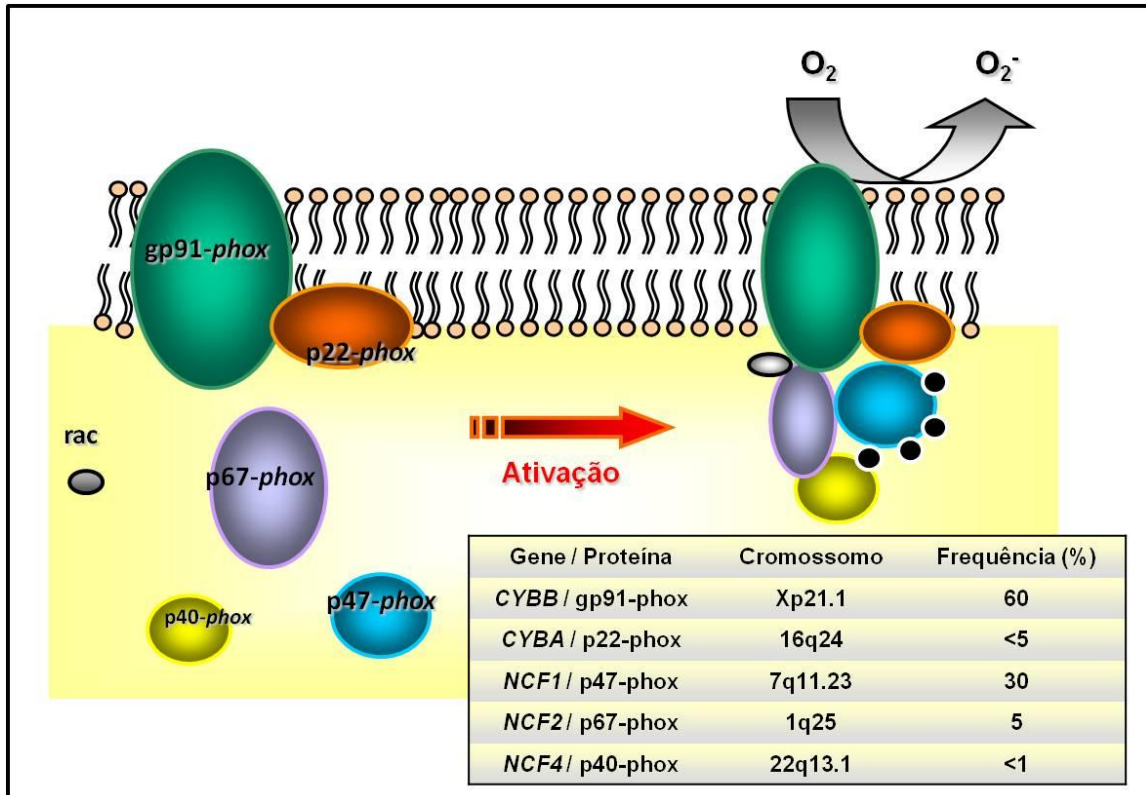


Figura 1. Sistema NADPH oxidase: Representação esquemática do Sistema NADPH oxidase com seus principais componentes: gp91-phox e p22-phox ligados a membrana celular formando o citocromo b_{558} ; p67-phox, p47-phox, p40-phox e a proteína rac presentes no citoplasma do fagócito. A ativação do Sistema ocorre com a fosforilação da p47-phox seguida do agrupamento de todos os componentes junto ao citocromo b_{558} reduzindo o oxigênio molecular (O_2) levando a formação do superóxido (O_2^-).

O modo de herança da DGC é definido pela abreviação “A” para autossômico ou “X” para ligado ao sexo; o componente defeituoso da oxidase é representado pelo peso molecular da proteína afetada, “91,” “22,” “47,” “67” ou “40”; e o nível de expressão da proteína daquele componente é indicado pelo sobrescrito “0” para ausente, “+” para presente, e “-” para reduzido. O fenótipo $X91^0$ é o mais frequente, secundário a defeitos no gene *CYBB* no cromossomo X, que codifica a proteína gp91-phox e resulta na ausência de citocromo b_{558} e atividade NADPH oxidase nula. O fenótipo $X91^-$ é menos frequente, e refere-se à forma variante da DGC, laboratorialmente caracterizada por neutrófilos com baixa atividade NADPH oxidase, proporcional ao nível de citocromo b_{558} expresso (Lew et al., 1981; Newburger et al., 1986; Roos et al., 1996; Rae et al., 1998; Holland, 2010). No fenótipo $X91^+$,

o citocromo *b*₅₅₈ encontra-se em níveis normais, entretanto sua atividade está diminuída ou ausente. A maioria das formas autossômicas recessivas de DGC não guarda expressão residual do componente afetado (fenótipos A22⁰, A47⁰, A67⁰ e A40⁰).

Dentre os defeitos genéticos de pacientes com DGC, ocorrem deleções, inserções e substituições. A maior parte destes pacientes tem 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 (Curnutte, 1993; Roos et al., 1996; Patino et al., 1999; Patino et al., 1999; Agudelo-Florez et al., 2006; Agudelo-Florez et al., 2006; Holland, 2010; Oliveira-Júnior et al., 2010 – ANEXO A). Desta maneira, o estudo dos pacientes com DGC, além de ilustrar a relevância clínica dos reativos intermediários do oxigênio, possibilitou a identificação dos diversos componentes da NADPH oxidase, bem como seus mecanismos de ativação (Dinauer et al., 2000; Babior, 2004; Holland, 2010).

1.1.1 Mutações na DGC ligada ao X

O gene *CYBB*, o qual codifica a grande subunidade glicosilada do citocromo *b*₅₅₈, denominada *gp91-phox*, contém 13 exons e ocupa aproximadamente 30 kb da região Xp21.1 do cromossomo X (Baehner et al., 1986). Diversos defeitos moleculares que levam a DGC ligada ao X foram identificados na região codante, introns e raramente nas regiões 5' reguladoras do gene *CYBB* (Patino et al., 1999; Heyworth et al., 2001; Heyworth et al., 2003; Barese et al., 2004; Jurkowska, et al., 2004; Oh et al., 2004; Barese et al., 2005; Agudelo-Florez et al., 2006; Agudelo-Florez et al., 2006; Lewis et al., 2008; Di Matteo et al., 2009; Oliveira-Júnior et al., 2010 – ANEXO A).

Os tipos de mutações que causam DGC ligada ao sexo incluem grandes deleções multigênicas, deleções e inserções menores, substituições do tipo “missense” e “nonsense”, bem como defeitos de “splicing”. Mutações nos sítios de “splicing” resultam no fenótipo X91⁰ devido à deleção de um ou mais exons, que levam a DGC ligada ao X (Roos et al., 1996; Rae et al., 1998; Segal et al., 2000; Winkelstein et al., 2000; Barese et al., 2005; Agudelo-Florez et al., 2006; Agudelo-Florez et al., 2006; Oliveira-Júnior et al., 2010 – ANEXO A). Entretanto, numa minoria de casos, tais mutações levam ao fenótipo X91⁻, devido à manutenção parcial do “splicing” normal (Rae et al., 1998). Vários estudos mostram que as mutações se distribuem com frequência similar entre os exons e as bordas dos genes (Roos et al., 1996; Rae et al., 1998; Winkelstein et al., 2000; Heyworth et al., 2001; Heyworth

et al., 2003; Agudelo-Florez et al., 2006; Stasia e Li, 2008; Oliveira-Júnior et al., 2010 – ANEXO A). Famílias não relacionadas nestes estudos serviram como base para os cálculos das frequências relativas de diferentes tipos de mutações. A heterogeneidade das mutações e a falta de um genótipo predominante mostram que a incidência mundial de DGC é consequência de muitos eventos mutacionais.

Rae et al. (1998) identificaram as mutações no gene *CYBB* que levaram ao fenótipo de DGC ligada ao sexo em 131 famílias consecutivas e independentes. O rastreamento por meio de SSCP ("single strand conformation polymorphism analysis") identificou mutações em 124 famílias. O sequenciamento completo dos exons e regiões próximas às bordas dos introns revelou outras 7 mutações. Neste estudo foi possível identificar 103 diferentes mutações específicas, sendo que nenhuma mutação isolada repetiu-se em mais de 7 famílias independentes. Os tipos de mutações foram grandes e pequenas deleções (11%), "frameshifts" (24%), mutações "nonsense" (23%), mutações "missense" (23%), mutações na região do "splicing" (17%) e mutações nas regiões reguladoras (2%). A distribuição das mutações ao longo do gene *CYBB* mostrou-se bastante heterogênea, não se identificando nenhum *locus* preferencial para sua ocorrência. Hoje, segundo base de dados e atualizações de mutações descritas no gene *CYBB*¹, existem mais de 580 casos descritos, sendo 256 mutações diferentes dos quais 30% são do tipo "missense", 30% "nonsense", 21% "frameshift" e 12% erros de "splicing".

Na América Latina, Patino et al. (1999) estudaram 7 famílias não relacionadas na Colômbia e no Brasil. Neste estudo do qual participamos, 6 mães eram portadoras de um alelo *CYBB* mutante, sendo que um dos casos deveu-se a mutação "de novo". Identificamos uma substituição A por G no penúltimo nucleotídeo do intron 12, quatro novas mutações "nonsense" (R91X, W106X, R157X, R290X), além de outras duas mutações "missense" (E225V, C244Y). Barese e colaboradores (Barese et al., 2005) estudaram 18 pacientes com DGC ligada ao X, tendo encontrado diversos tipos de mutações.

Nosso grupo estudou 14 pacientes, sendo 7 com a forma de DGC ligada ao X e 7 com DGC autossômica por defeito no componente p47-*phox* (Agudelo-Florez et al., 2006). Nesse estudo, os pacientes mostraram grande heterogeneidade clínica e genética, sendo os casos ligados ao X mais graves, além de relatar duas novas mutações e detectar três pacientes com mutações em sítios de "splicing".

¹ (<http://bioinf.uta.fi/CYBBbase>)

1.1.2 Mutações na DGC autossômica

O número de mutações identificadas em pacientes com DGC autossômica é menor que na DGC ligada ao X, devido à menor incidência de DGC autossômica. Alguns trabalhos indicam que as bases genético-moleculares das deficiências de p22-*phox* e p67-*phox* são tão heterogêneas quanto às observadas nas deficiências de gp91-*phox*, ligadas ao X, enquanto os casos de deficiência de p47-*phox* são mais homogêneos (Roos et al., 1996; Rae et al., 1998; Prando-Andrade et al., 2004; Stasia e Li, 2008).

Em 9 famílias com mutações na p22-*phox*, 10 diferentes mutações foram descobertas em 18 alelos, incluindo deleções e inserções, substituições próximas aos sítios de “splicing”, e mutações missense (MIM 233690) (De Boer et al., 1992; Roos et al., 1996). Em 7 famílias os pacientes eram homozigotos para as mutações encontradas, enquanto em 2 famílias os pacientes eram heterozigotos compostos. Somente em 2 famílias não relacionadas, foram encontrados pacientes com a mesma mutação. Somente 4 polimorfismos da p22-*phox* foram identificados. Portanto, pequenas alterações na composição desta proteína parecem resultar em instabilidade intrínseca ou instabilidade secundária a baixa interação com a gp91-*phox*, ao compor o citocromo *b*₅₅₈ (Dinauer et al., 2000).

As mutações que levam a DGC autossômica por defeitos na p47-*phox* têm sido um enigma para os cientistas. Em 35 pacientes não relacionados com deficiência da p47-*phox* (MIM 233700), foi identificada uma deleção de 2 nucleotídeos na repetição GTGT, correspondente às 4 primeiras bases do segundo exon do gene *NCF1* (Casimir et al., 1991; Volpp e Lin, 1993; Iwata et al., 1994; Vazquez et al., 2001). Em 31 destes casos a deleção GT foi homozigota e em um dos outros 4 pacientes, outra mutação de um nucleotídeo foi identificada além da deleção GT. Surpreendentemente no entanto, a amplificação por PCR do cDNA ou gDNA de indivíduos normais, também revelou a presença simultânea da sequência GTGT e do produto com a deleção GT. Isto sugeriu a existência de um pseudogene com a deleção GT, além do gene *NCF1*, em parte do genoma de indivíduos saudáveis, e que a DGC autossômica por defeito da p47-*phox* se deve à recombinação entre o gene *NCF1* e o pseudogene relacionado (Gorlach et al., 1997). Hoje sabemos que existem dois pseudogenes diferentes *NCF1B* e *NCF1C*, sendo o último o de sequência mais semelhante ao gene funcional (Figura 2). Num estudo com pacientes DGC, foi confirmado a mutação mais frequente na p47-*phox* em 7 casos. Os pacientes deste subgrupo apresentaram evolução clínica mais benigna quando comparados aos portadores da forma ligada ao X (Prando-Andrade, 2003; Agudelo-Florez et al., 2006). Recentemente, foram também descritos casos de

DGC secundários a defeitos na *p47-phox*, por mutações não relacionadas ao pseudogene (Noack et al., 2001). Alguns trabalhos publicados mostraram que existe um novo tipo de pseudogene *NCF1* que apresenta a mesma sequência GTGT do gene *NCF1* funcional, classificado como pseudogene do Tipo II (Heyworth et al., 2002). Este novo tipo de pseudogene foi descoberto depois que o grupo de pesquisadores avaliou a razão entre a deleção GT versus GTGT entre indivíduos normais, portadores sãos e pacientes DGC A47°. Por meio do método de “scan-gene”, (Dekker et al., 2001) revelaram um padrão diferente do normal entre a razão pseudogene (delGT) - 2:1 - gene (GTGT) que indica indivíduos normais, revelando também razões 1:1 e 1:2 dentro deste grupo. Além disso, em outros indivíduos com padrão 5:1 que indicaria os portadores neste método, encontraram também razão do tipo 2:1, semelhante aos indivíduos normais, mostrando complexidade em se avaliar indivíduos portadores da deleção GT no exon 2 do gene *NCF1* (Figura 3).

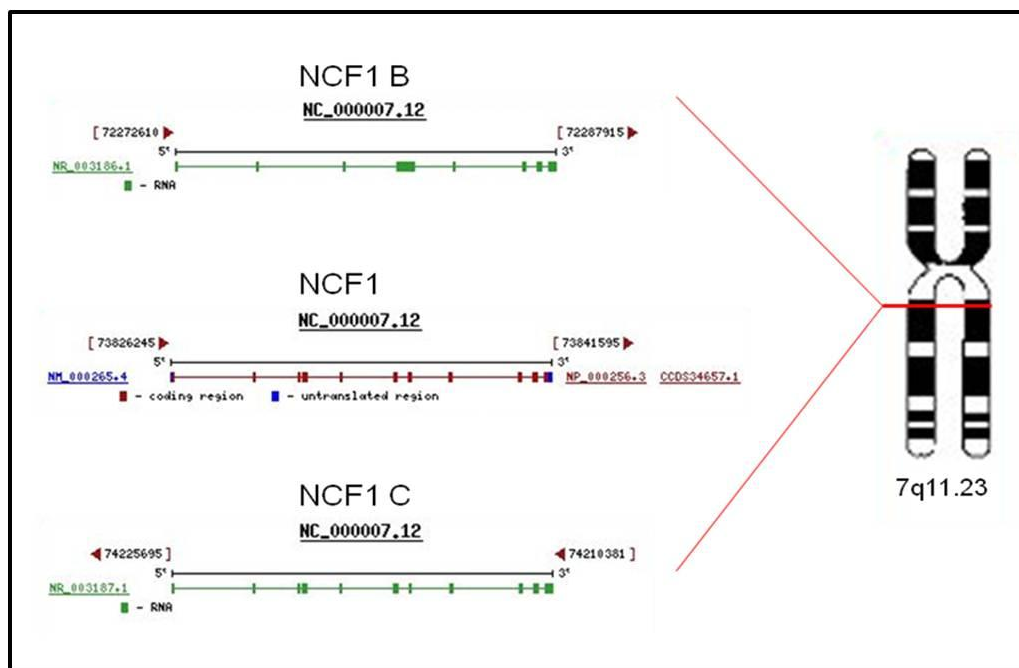


Figura 2. Posição do gene *NCF1* e pseudogenes localizados no cromossomo 7 do genoma humano. O pseudogene *NCF1 C* é uma cópia quase exata do gene funcional *NCF1* (ao meio), o que dificulta a identificação de mutações por meio de ensaios simples e comuns de biologia molecular.

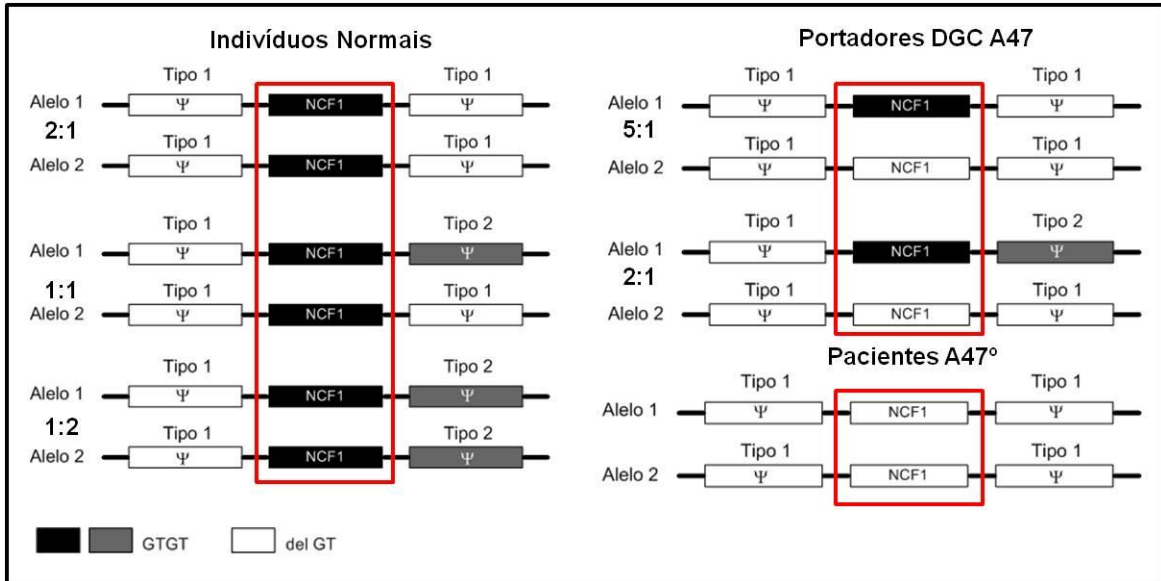


Figura 3. Versão modificada da predição entre genótipos do *NCF1* / ψ *NCF1* mostrando combinações entre tipo 1 e o tipo 2 do pseudogene em indivíduos normais, portadores e pacientes DGC. Nas barras fechadas estão representadas o gene *NCF1* normal (preto) e o pseudogene tipo 2 (cinza) que possuem a sequência GTGT no exon 2. Nas barras abertas estão representadas o gene *NCF1* e o pseudogene tipo 1 que possuem a deleção GT no exon 2, que na forma homocigota leva a DGC autossômica A47°. A seleção representa o gene *NCF1* funcional
 FONTE: Adaptado de Heyworth et al. (2002).

1.1.3 Caracterização Clínica da DGC

No geral os casos de DGC autossômica *p22-phox* e *p67-phox* são tão graves quanto os casos de DGC ligada ao X *gp91-phox*. Por outro lado, diversas comparações clínicas entre DGC ligada ao X e DGC autossômica secundária a defeitos na *p47-phox* sugerem que esta última tem evolução mais benigna (Weening et al., 1985; Margolis et al., 1990; Prando-Andrade et al., 2004; Agudelo-Florez et al., 2006), o que pode ser atribuída à atividade NADPH oxidase residual (Cross et al., 1994; Bemiller et al., 1995; Cross et al., 1995; Winkelstein et al., 2000; Holland, 2010).

O prognóstico de pacientes com DGC melhorou significativamente desde que a doença foi descoberta na década de cinquenta, quando era denominada “granulomatose fatal da infância”. Os pilares do tratamento da DGC são: 1) prevenção das infecções por meio de imunizações e remoção das fontes de patógenos, 2) uso profilático de trimetoprim-sulfametoxazol ou outro antimicrobiano com penetração intracelular, 3) uso profilático de IFN- γ , 4) uso precoce e agressivo de antibióticos parenterais, 5) drenagem cirúrgica ou

ressecção de focos infecciosos persistentes. Dos cinco itens, o mais importante é a intervenção precoce nas infecções, antes que elas sobrepujem o comprometido sistema imunológico do paciente com DGC (Segal et al., 2000; Heyworth et al., 2003; Holland, 2010).

O IFN- γ humano recombinante está indicado na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de superfície corporal, por via subcutânea, três vezes por semana. Ele reduz o risco relativo de infecções graves em 70%. Demonstrou-se que o IFN- γ incrementa a fidelidade do "splicing" e a estabilidade dos transcritos do gene *CYBB*, corrigindo parcialmente a expressão do componente gp91-*phox*, atenuando o fenótipo de DGC ligada ao X em uma família especialmente responsável ao IFN- γ (Rae et al., 1998; Condino-Neto e Newburger, 2000; Errante et al., 2008). O IFN- γ continua sendo uma terapia segura para a prevenção de infecções graves em pacientes com DGC (Marciano et al., 2004; Errante et al., 2008).

Transplante de medula óssea é uma técnica atraente porque pode levar a cura estável da DGC. Várias abordagens estão em uso, utilizando-se mieloblação total, que quando bem-sucedido, há completo "engraftment" (Seger et al., 2002), e sem mieloblação, levando a quimerismo hematopoiético estável (Kamani et al., 1988). Baixa intensidade de transplantes "não-ablativos" ou "mini" transplantes em irmãos HLA-idênticos de pacientes DGC tiveram um misto de sucessos (Horwitz et al., 2001). O sucesso dos transplantes de medula óssea é maior em crianças que em adultos. Relatórios recentes sobre independentes transplantes de medula óssea em Newcastle (Soncini et al., 2009) mostram uma taxa de sucesso global a longo prazo de 90%. Estes investigadores britânicos também mostraram uma reconstituição impressionante pré-transplante, sugerindo que muito da demora visto na DGC e retardo de crescimento é de fato devido a vários aspectos da disfunção hematopoiética, variando de colite a infecção crônica. Apesar do transplante de medula óssea ser uma opção atraente para a cura definitiva da DGC, devemos ter em mente que a sobrevivência sem transplante de medula óssea é aproximadamente comparável (Holland, 2010). No entanto, nem todos os pacientes têm correspondência coligadas ou doadores, excluindo efetivamente um número substancial de pacientes desta opção (Seger, 2008). DGC ligada ao X é um alvo atraente para terapia genética por vários motivos: é um defeito num único gene, que pode ser reconstituído *in vitro* e a correção não precisa estar completa para oferecer proteção total (Kang e Malech, 2009). Este último ponto é comprovado por uma vida normal de muitas portadoras da DGC ligada ao X, bem como pelas quimeras estáveis geradas em alguns protocolos de transplante.

Com base num estudo com 368 pacientes DGC nos EUA, as complicações mais comuns em DGC são pneumonia (79%), abscesso subcutâneo (42%), abscesso hepático

(27%), osteomielites (25%), e sepse (18%) (Winkelstein et al., 2000). Outro estudo envolvendo 60 pacientes com DGC na Itália demonstrou que pneumonia (47%) e linfadenite (45%) são as complicações mais comuns, seguidas por dermatite (26%), abscesso subcutâneo (20%), abscesso hepático (16%) e osteomielite (16%) (Martire et al., 2008). Com uma análise clínica profunda destes pacientes podemos identificar relações com o estado genético e futuramente direcionar estes pacientes para um melhor tratamento, e talvez exclusivos para cada grupo ou indivíduos de acordo com seu genoma.

6 CONCLUSÕES

- O método dHPLC é mais sensível e eficaz na triagem de mutações no gene *CYBB*, comparado ao método SSCP, permitindo elucidar casos complexos;
- Identificamos 10 (dez) casos de DGC ligado ao X, com 7 (sete) diferentes mutações no gene *CYBB*, dos quais 4 (quatro) delas são inéditas na literatura;
- Identificamos 2 (dois) casos DGC autossômica com uma mutação comum no gene *NCF1*;
- Desenvolvemos uma inovadora fórmula para correlacionar genótipo versus fenótipo clínico nos pacientes DGC, demonstrado em gráficos monocromáticos graduais (qualitativo) ou pelo IGC (Índice de Gravidade Clínica / quantitativo).
- O IGC indicou claramente que pacientes com mutações no gene *NCF1* apresentam menor gravidade clínica que os pacientes com mutações no gene *CYBB*. Porém, na comparação entre os diferentes grupos com diferentes tipos de mutações no gene *CYBB* não houve diferença estatística significativa.

REFERÊNCIAS*

Agudelo-Florez P, Lopez JA, Redher J, Carneiro-Sampaio MM, Costa-Carvalho BT, Grumach AS, Condino-Neto A. The use of reverse transcription-PCR for the diagnosis of X-linked chronic granulomatous disease. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:625-34.

Agudelo-Florez P, Navarro S, Luttes P, Lopez JA, Norambuena X, Navarrete SC, Quezada A, Spencer M, Condino-Neto A, Cornejo de M. Report of a new mutation in CYBB gene in two patients with X linked chronic granulomatous disease. *Rev Med Chil.* 2006;134:965-72.

Agudelo-Florez P, Prando-Andrade CC, Lopez JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FJ, de Souza Paiva MA, Roxo P, Jr., Grumach A, Jacob CA et al. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46:243-52.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-10.

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

Baehner RL, Kunkel LM, Monaco AP, Haines JL, Conneally PM, Palmer C, Heerema N, Orkin SH. DNA linkage analysis of X chromosome-linked chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:3398-401.

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

Barese CN, Copelli SB, De Matteo E, Zandomeni R, Salgueiro F, Di Giovanni D, Heyworth P, Rivas EM. Molecular characterization of a novel splice site mutation within the CYBB gene leading to X-linked chronic granulomatous disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2005;44:420-2.

Bemiller LS, Roberts DH, Starko KM, Curnutte JT. Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis.* 1995;21:239-47.

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

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968;97:77-89.

* De acordo com:

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

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

Buckley RH. Primary immunodeficiency or not? Making the correct diagnosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:756-8.

Casimir CM, Bu-Ghanim HN, Rodaway AR, Bentley DL, Rowe P, Segal AW. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:2753-7.

Chien SC, Lee CN, Hung CC, Tsao PN, Su YN, Hsieh FJ. 2003. Rapid prenatal diagnosis of X-linked chronic granulomatous disease using a denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) system. *Prenat Diagn*. 2003;23:1092-6.

Clark RA, Malech HL, Gallin JI, Nuno H, Volpp BD, Pearson DW, Nauseef WM, Curnutte JT. Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med*. 1989;321:647-52.

Condino-neto A, Muscara MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandao AC, Grumach AS, De Nucci G. 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, Muscara MN, Grumach AS, Carneiro-Sampaio MM, De Nucci G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol*. 1993;35:485-90.

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

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

Cross AR, Heyworth PG, Rae J, Curnutte JT. A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b. *J Biol Chem*. 1995;270:8194-200.

Cross AR, Yarchover JL, Curnutte JT. The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox. *J Biol Chem*. 1994;269:21448-54.

Curnutte JT. Classification of chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1988; 2:241-52.

Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol*, 1993;67: S2-15.

- Curnutte JT, Erickson RW, Ding J, Badwey JA. Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *J Biol Chem.*1994;269:10813-9.
- de Boer M, de Klein A, Hossle JP, Seger R, Corbeel L, Weening RS, Roos D. 1992. Cytochrome b558-negative, autosomal recessive chronic granulomatous disease: two new mutations in the cytochrome b558 light chain of the NADPH oxidase (p22-phox). *Am J Hum Genet.* 1992;51:1127-35.
- de Boer M, Singh V, Dekker J, Di Rocco M, Goldblatt D, Roos D. 2002. Prenatal diagnosis in two families with autosomal, p47(phox)-deficient chronic granulomatous disease due to a novel point mutation in NCF1. *Prenat Diagn,* 2002;22:235-40.
- Dekker J, de Boer M, Roos D. 2001. Gene-scan method for the recognition of carriers and patients with p47(phox)-deficient autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Exp Hematol.* 2001;29:1319-25.
- Di Matteo G, Giordani L, Finocchi A, Ventura A, Chiriaco M, Blancato J, Sinibaldi C, Plebani A, Soresina A, Pignata C et al. Molecular characterization of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease and identification of novel CYBB mutations: an Italian multicenter study. *Mol Immunol.* 2009;46:1935-41
- Dias-Da-Motta P, Arruda VR, Muscara MN, Saad ST, De Nucci G, Costa FF, Condino-Neto A. The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 1996;93:333-40.
- Dinauer MC, Lekstrom-Himes JA, Dale DC. Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2000; 303-318
- Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, 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.
- Errante PR, Frazao JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2008;3:225-30.
- Ewing B e Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998;8:186-94.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998;8:175-85.
- Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Johnston RB, Jr. Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1988;2:253-66.
- Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res,* 1998;8:195-202.

Gorlach A, Lee PL, Roesler J, Hopkins PJ, Christensen B, Green ED, Chanock SJ, Curnutte JT. A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox- deficient chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 1997;100:1907-18.

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

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

Heyworth PG, Noack D, Cross AR. Identification of a novel NCF-1 (p47-phox) pseudogene not containing the signature GT deletion: significance for A47 degrees chronic granulomatous disease carrier detection. *Blood.* 2002;100:1845-51.

Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;38:3-10.

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.

Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, Good RA. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet.* 1966;1:1225-8.

Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, Carter CS, Childs R, Gallin JI, Holland SM, Linton GF, Miller JA, Leitman SF et al. Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N Engl J Med.* 2001;344:881-8.

Iwata M, Nuno H, Yamazaki H, Nakano T, Niwa H, Tsuruta S, Ohga S, Ohmi S, Kanegasaki S, Matsuda I. Homologous dinucleotide (GT or TG) deletion in Japanese patients with chronic granulomatous disease with p47-phox deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199:1372-7.

Johnston-Junior RB. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol.* 2001;8:17-22.

Jurkowska M, Bernatowska E, Bal J. Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2004;52:113-20.

Kamani N, August CS, Campbell DE, Hassan NF, Douglas SD. Marrow transplantation in chronic granulomatous disease: an update, with 6-year follow-up. *J Pediatr.* 1988;113:697-700.

Kang EM e Malech HL. Advances in treatment for chronic granulomatous disease. *Immunol Res.* 2009;43:77-84.

Landing BH e Shirkey HS. A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes. *Pediatrics,* 1957;20:431-8.

Lew PD, Southwick FS, Stossel TP, Whitin JC, Simons E, Cohen HJ. A variant of chronic granulomatous disease: deficient oxidative metabolism due to a low-affinity NADPH oxidase. *N Engl J Med*. 1981;305:1329-33.

Lewis EM, Singla M, Sergeant S, Koty PP, McPhail LC. X-linked chronic granulomatous disease secondary to skewed X chromosome inactivation in a female with a novel CYBB mutation and late presentation. *Clin Immunol*. 2008;129:372-80.

Liu Q, Feng J, Sommer SS. Bi-directional dideoxy fingerprinting (Bi-ddF): a rapid method for quantitative detection of mutations in genomic regions of 300-600 bp. *Hum Mol Genet*. 1996;5:107-14.

Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, Malech HL, Gallin JI, Holland SM. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2004;39:692-9.

Margolis DM, Melnick DA, Alling DW, Gallin JI. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *J Infect Dis*. 1990;162:723-6.

Martire B, Rondelli R, Soresina A, Pignata C, Broccoletti T, Finocchi A, Rossi P, Gattorno M, Rabusin M, Azzari C et al. Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: an Italian multicenter study. *Clin Immunol*. 2008;126:-64.

Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*. 2009;114:3309-15.

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

Mccord JM e Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*. 1969b;244:6056-63.

Movahedi M, Aghamohammadi A, Rezaei N, Farhoudi A, Pourpak Z, Moin M, Gharagozlou M, Mansouri D, Arshi S, Atarod L et al. Gastrointestinal manifestations of patients with chronic granulomatous disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2004;3:83-7.

Newburger PE, Luscinskas FW, Ryan T, Beard CJ, Wright J, Platt OS, Simons ER, Tauber AI. Variant chronic granulomatous disease: modulation of the neutrophil defect by severe infection. *Blood*. 1986;68:914-9.

Nilsson K, Klein G, Henle W, Henle G. The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV. *Int J Cancer*. 1971;8:443-50.

Noack D, Rae J, Cross AR, Ellis BA, Newburger PE, Curnutte JT, Heyworth PG. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the

phagocyte p47-phox: mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes. *Blood*. 2001;97:305-11.

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

O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics*. 1998;52:44-9.

Oh HB, Park JS, Lee W, Yoo SJ, Yang JH, Oh SY. Molecular analysis of X-linked chronic granulomatous disease in five unrelated Korean patients. *J Korean Med Sci*. 2004;19:218-22.

Oliveira-Júnior EB, Prando C, Alvaro Lopez J, Arango JC, Buzolin M, Rehder J, Formighier E, Pedroza LA, Frazão JB, Dantas VM, Costa-Carvalho BT, Grumach AS, Bustamante J, Condino-Neto A. DHPLC is more Effective than SSCP for Screening Mutations in CYBB gene: Report of Four New Mutations Leading to X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *Human Mutation*. In press.

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

Patino PJ, Perez JE, Lopez JA, Condino-Neto A, Grumach AS, Botero JH, Curnutte JT, Garcia de Olarte D. Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-phox. *Hum Mutat*. 1999;13:29-37.

Patino PJ, Rae J, Noack D, Erickson R, Ding J, de Olarte DG, Curnutte JT. 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;94:2505-14.

Prando-Andrade C, Agudelo-Florez P, Lopez JA, Paiva MA, Costa-Carvalho BT, Condino-Neto A. Autosomal chronic granulomatous disease: case report and mutation analysis of two Brazilian siblings. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:425-8.

Prando-Andrade C, Grumach A, Condino-Neto A. Aspectos Clínicos de Pacientes Sob Suspeita de Imunodeficiência Fagocitária. [Dissertação (Mestrado em saúde da criança e do adolescente)] São Paulo (Brasil): Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 2003.

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

Ravnik-Glavac M, Atkinson A, Glavac D, Dean M. DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations. *Hum Mutat*. 2002;19:374-83.

Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet.* 1994;3:801-7.

Rohlin A, Wernersson J, Engwall Y, Wiklund L, Bjork J, Nordling M. Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Hum Mutat.* 2009;30:1012-20.

Roos D, de Boer M, Koker MY, Dekker J, Singh-Gupta V, Ahlin A, Palmblad J, Sanal O, Kurenko-Deptuch M, Jolles S et al. Chronic granulomatous disease caused by mutations other than the common GT deletion in NCF1, the gene encoding the p47phox component of the phagocyte NADPH oxidase. *Hum Mutat.* 2006;27:1218-29.

Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* 1996;87:1663-81.

Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften.* 1988;75:354-5.

Segal BH e Holland SM. Primary phagocytic disorders of childhood. *Pediatr Clin North Am.* 2000;47:1311-38.

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 BH, Sakamoto N, Patel M, Maemura K, Klein AS, Holland SM, Bulkley GB. Xanthine oxidase contributes to host defense against *Burkholderia cepacia* in the p47(phox^{-/-}) mouse model of chronic granulomatous disease. *Infect Immun.* 2000;68:2374-8.

Segal ML, Fertel RH, Kraut EH, Sagone AL. The role of reactive oxygen species in thromboxane b2 generation by polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med.* 1983;102:788-94.

Seger RA. Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol.* 2008;140:255-66.

Seger RA, Gungor T, Belohradsky BH, Blanche S, Bordigoni P, Di Bartolomeo P, Flood T, Landais P, Muller S, Ozsahin H et al. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. *Blood.* 2002;100:4344-50.

Soncini E, Slatter MA, Jones LB, Hughes S, Hodges S, Flood TJ, Barge D, Spickett GP, Jackson GH, Collin MP et al. Unrelated donor and HLA-identical sibling haematopoietic stem cell transplantation cure chronic granulomatous disease with good long-term outcome and growth. *Br J Haematol.* 2009;145:73-83.

Stasia MJ e Li XJ. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol.* 2008;30:209-35.

Tauber AI, Borregaard N, Simons E, Wright J. Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine (Baltimore)*. 1983;62:286-309.

Vazquez N, Lehrnbecher T, Chen R, Christensen BL, Gallin JI, Malech H, Holland S, Zhu S, Chanock SJ. Mutational analysis of patients with p47-phox-deficient chronic granulomatous disease: The significance of recombination events between the p47-phox gene (NCF1) and its highly homologous pseudogenes. *Exp Hematol*. 2001;29:234-43.

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;133:3006-9.

Volpp BD e Lin Y. In vitro molecular reconstitution of the respiratory burst in B lymphoblasts from p47-phox-deficient chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*, 1993;91:201-7.

von Goessel H, Hossle JP, Seger R, Gungor T. Characterization of 17 new cases of X-linked chronic granulomatous disease with seven novel mutations in the CYBB gene. *Exp Hematol*. 2006;34:528-35.

Weening RS, Adriaansz LH, Weemaes CM, Lutter R, Roos D. Clinical differences in chronic granulomatous disease in patients with cytochrome b-negative or cytochrome b-positive neutrophils. *J Pediatr*, 1985;107:102-4.

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

Xiao W e Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*. 2001;17:439-74.

Xiao W, Stern D, Jain M, Huber CG, Oefner PJ. Multiplex capillary denaturing high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Biotechniques*. 2001;30:1332-8.