NURIA BENGALA ZURRO

**ESPECTRO CLÍNICO E DEFEITOS GENÉTICO-MOLECUL0ARES
DE PACIENTES COM DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA**

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

São Paulo
2013

NURIA BENGALA ZURRO

**ESPECTRO CLÍNICO E DEFEITOS GENÉTICO-MOLECULARES
DE PACIENTES COM DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA**

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

Área de concentração: Imunología

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zurro, Nuria Bengala.

Espectro clínico e defeitos genético-moleculares de pacientes com doença granulomatosa crônica / Nuria Bengala Zurro. – São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunidade inata.

Versão do título para o inglês: Clinical spectrum and molecular-genetic defects in patients with chronic granulomatous disease.

1. Doença granulomatosa crônica 2. Fagócitos 3. Imunodeficiência primária 4. NADPH oxidase 5. CYBB 6. NCF1 I. Neto, Prof. Dr. Antonio Condino II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0223/2013

Candidato(a): Nuria Bengala Zurro.

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): _____
Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Examinador(a): _____ Assinatura: _____
 Nome: _____
 Instituição: _____

Presidente: _____
Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de setembro de 2012.

PARECER 1065/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, nesta data **APROVOU** o projeto intitulado: "*Espectro clínico e defeitos genético-moleculares de pacientes com doença granulomatosa crônica*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. **ANTONIO CONDINO NETO** e a aluna **NURIA BENGALA ZURRO**.

Cabe os pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **05.09.2013**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M.A. ZANOTTO**

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho às minhas irmãs Sindy e Kenia.

*O frescor de seus sorrisos e o brilho de seus olhares
me acompanham todo momento, em qualquer lugar.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antonio Condino Neto, pela confiança absoluta desde o primeiro momento, pela orientação precisa e a possibilidade de desenvolver-me como pesquisadora.

A Universidade de São Paulo pela possibilidade de continuar aprendendo.

A minha mãe, por todo o amor. Por me ensinar a lutar pelo desejado mesmo enfrentando obstáculos. Obrigada pelo valor e o exemplo constante.

Ao meu pai pelos abraços eternos e as palavras sensatas carregadas de amor.

Às minhas irmãs Sindy e Kenia e meu irmão Nehuén pela alegria que brindam a minha vida.

A minha família de coração Monica, Cacho, tios e primos pelo apoio nos momentos difíceis e o carinho constante.

A Maria Emilia, Santiago, Jorge e Silvina pela ajuda e a boa energia nos momentos mais difíceis da adaptação.

A minha amiga Paola Ojeda, pelo carinho que fortalece nosso vínculo ao longo dos anos.

A minha amiga Marina Wall pelo vivido, viajado e dançado juntas.

A Monica e Adriana pela amizade e o apoio sempre.

A minha turma de amigas e amigos da vida, aqueles que me acompanharam sempre e nunca me deixaram sentir longe, só Deus sabe o importante que foram nos momentos mais difíceis.

Vanesa, Cristina, Carolina, Rocio, Patricia e Sirley...

Dardo, Elio, Cesar e Gustavo...

A minha “mãe” em São Paulo, Cristina Arslani pelas palavras de apoio e o carinho diário, sempre trabalhando e sorrindo.

A secretaria Silvana Lucchini pela eficiência e disponibilidade.

Aos médicos pela importante colaboração durante os dois anos de trabalho conjunto.

Aos pequenos pacientes, sem eles nossa pesquisa seria impossível.

A minha família em SP, sem vocês tudo seria sem cor. Obrigada pelo aprendizado conjunto, pelos encontros e desencontros, pelas viagens e o compartilhado cotidianamente no laboratório.

Marilia, Paulo, Angela, Zé, Otavio, Walmir, Paty, Edgar, Lena, Josias, Stefanie e Taj.

TODOS ficaram sempre nas minhas melhores lembranças.

RESUMO

Zurro NB. Espectro clínico e defeitos genético-moleculares de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A doença granulomatosa crônica (DGC) é uma imunodeficiência primária (IDP) dos fagócitos causada por mutações nos componentes da fosfato dinucleotídeo nicotinamida oxidase, ou sistema NADPH oxidase (gp91-phox, p22-phox, p47-phox, p67-phox e p40-phox) resultando numa explosão respiratória ausente ou muito reduzida. Portanto, pacientes com DGC apresentam maior susceptibilidade a infecções e formação de granulomas como consequência do defeito na atividade microbicida e na regulação da resposta inflamatória. Nosso objetivo foi realizar análise genético-molecular do complexo NADPH oxidase em pacientes brasileiros com diagnóstico clínico de DGC. Cinquenta e quatro pacientes com diagnóstico clínico sugestivo da DGC foram incluídos em nosso estudo no período de dois anos (2012-2013). A explosão respiratória de neutrófilos e monócitos foi avaliada pelo teste funcional semiquantitativo da *dihydrorhodamine-1,2,3* (DHR) e analisados por citometria de fluxo, após 30 minutos de incubação com *phorbol-miristate-acetate-14-12* (PMA, 90nm). Dezoito pacientes apresentaram defeito na explosão respiratória, enquanto trinta e seis apresentaram explosão respiratória normal. A análise clínica de dezesseis pacientes evidenciou um amplo espectro de infecções recorrentes como abscessos de pele, pneumonias, amigdalites e osteomielite provocada por organismos como *S. aureus* e *A. fumigatus* principalmente e colite inflamatória. A expressão de proteínas do sistema NADPH oxidase de oito desses pacientes foi analisada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos conjugados. Cinco pacientes do sexo masculino exibiram expressão reduzida de gp91-phox e uma paciente do sexo feminino exibiu uma baixa expressão da proteína p47-phox. O DNA genômico (DNAg) dos dezoito pacientes com explosão respiratória defeituosa foi extraído, os genes da cadeia beta polipeptídica do complexo citocromo *b*₅₅₈ (*CYBB*, localizado no cromossomo X) e o factor citoplasmático de neutrófilos (*NCF1*, localizado no cromossomo 7), que codificam as proteínas gp91-phox e p47-phox, respectivamente, foram sequenciados. Estes são os genes mais frequentemente mutados nos pacientes DGC. Um paciente do sexo masculino mostrou a mutação *nonsense* c.271C > T; p.Arg91X que leva à um códon de parada prematura no exon 3 do gene *CYBB*, enquanto outro paciente exibiu uma mutação na borda intrônica do exon 11 do gene *CYBB*. Três pacientes do sexo feminino apresentaram a mutação c.75_76delGT, deleção *frameshift* no gene *NCF1*. Esta mutação está localizada numa região de repetição GT (GTGT) no início do exon 2 e cria um códon de parada prematuro no aminoácido 26 da proteína p47-phox (p.Tyr26fsX26), comumente conhecida nos pacientes femininos com DGC. Concluímos que o quadro clínico e análise molecular de pacientes brasileiros com DGC foram heterogêneos, em conformidade com os dados da literatura.

Palavras-chave: Doença Granulomatosa Crônica. Sistema NADPH oxidase. Fagócitos. *NCF1*. *CYBB*.

ABSTRACT

Zurro NB. Clinical spectrum and molecular genetic defects in patients with chronic Granulomatous Disease. [Master dissertation (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Chronic granulomatous disease (CGD) is a primary immunodeficiency (PID) of phagocytes caused by mutations in components of the nicotinamide dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (gp91-phox, p22-phox, p47-phox, p67-phox and p40-phox) resulting in absent or defective oxidative burst of phagocytes. Therefore, patients with CGD have increased susceptibility to infections and granuloma formation as a consequence of defective microbicidal activity and regulation of the inflammatory response. Our aim was to perform a molecular genetic analysis of Brazilian patients with clinical diagnosis of CGD. Fifty-four patients with a clinical diagnosis suggestive of CGD were included in our study during two years (2012-2013). The respiratory burst activity of neutrophils and monocytes were evaluated by the semi-quantitative dihydrorhodamine -1,2,3 (DHR) test and analyzed by flow cytometry after 30 minutes incubation with phorbol -myristate - acetate 14 -12 (PMA , 90 nm). Eighteen patients had defective oxidative burst, whereas thirty-six presented normal respiratory burst activity. Clinical analysis of sixteen patients showed a broad spectrum of recurrent infections such as skin abscesses, pneumonia, tonsillitis, osteomyelitis caused by organisms such as *S. aureus* and *A. fumigatus* particularly and inflammatory colitis. Protein expression of NADPH oxidase components in eight of these patients were analyzed by flow cytometry using conjugated antibodies. Five male patients exhibited a reduced expression of gp91-phox and one female patient exhibited a low expression of p47-phox. Genomic DNA (gDNA) of the eighteen patients with decreased oxidative burst was extracted, the genes of the beta chain polypeptide complex of cytochrome *b*₅₅₈ (*CYBB*, located on the X chromosome) and neutrophil cytoplasmic factor (*NCF1*, located on chromosome 7), encoding gp91-phox and p47-phox respectively, were sequenced. These are the most frequently mutated genes in CGD patients. A male patient showed a nonsense mutation c.271C > T; p.Arg91X creating a premature stop codon in exon 3 of *CYBB*, while another patient showed a mutation in exon 11 at the intronic border of *CYBB*. Three female patients presented the c.75_76delGT frameshift deletion within *NCF1*. This mutation is located in a GT repeat region (GTGT) at the beginning of exon 2 and creates a premature stop codon at amino acid 26 of the protein p47-phox (p.Tyr26fsX26) commonly known in female patients with CGD. We conclude that the clinical history and molecular genetic abnormalities found in Brazilian patients with CGD are heterogenous, in accordance with the literature.

Keywords: Chronic Granulomatous Disease. NADPH system oxidase. Phagocytes. *NCF1*. *CYBB*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Componentes protéicos do sistema NADPH oxidase e genes que os codificam	20
Figura 2 - Esquema representativo da produção de espécies reativas de oxigênio no fagolisossomo dos fagócitos.....	24
Figura 3 - Esquema representativo do modo de herança da DGC ligada ao X.....	25
Figura 4 - Posição do gene <i>NCF1</i> e pseudogenes localizados no cromossomo 7 do genoma humano.....	28
Figura 5 - Faixa etária de pacientes com diagnóstico DGC.....	42
Figura 6 - Infecções recorrentes apresentadas pelos pacientes DGC.....	43
Figura 7 - Patógenos isolados dos pacientes com diagnóstico DGC.....	45
Figura 8 - Esquema representativo do análise do DHR nas amostras analisadas por meio de citometria de fluxo.....	50
Figura 9 - Resultado do teste de DHR em pacientes com diagnóstico sugestivo de DGC e controles sadios	51
Figura 10 - Análise estatística pelo teste de Mann-Whitney dos valores de MFI pelo teste de DHR.....	52
Figura 11 - Avaliação das proteínas do sistema NADPH oxidase	54
Figura 12 - Sequências de DNAg do gene <i>NCF1</i>	57
Figura 13 - Sequência de DNAg do exon 3 do gene <i>CYBB</i>	58
Figura 14 - Sequência de DNAg do exon 11, deleção do G	59
Figura 15 - Sequência de DNAg do exon 9, mutação <i>nonsense</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais e fluorocromos utilizados na marcação intra e extracelular dos componentes do sistema NADPH oxidase	38
Tabela 2 - Detalhe das sequências de oligonucleotidos utilizados no sequenciamento dos genes <i>NCF1</i> e <i>CYBB</i>	40
Tabela 3 - Histórico clínico dos pacientes DGC.....	45
Tabela 4 - Histórico clínico dos pacientes sem diagnóstico DGC.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	bacilo Calmette-Guerin
CD11b	do inglês <i>cluster of differentiation molecule 11b</i> (Mac-1)
CD18	do inglês <i>cluster of differentiation molecule 18</i> (Mac-1)
CXCR1	do inglês <i>CXC chemokine receptor 1</i>
DAG	diacilglicerol
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DNA	do inglês <i>desoxiribonucleic acid</i>
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ERO	espécies reativas de oxigênio
ESP	espontâneo
FAD	do inglês <i>flavin adenine dinucleotide</i>
GCSF	do inglês <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
FITC	fluoresceína isotiocianato
GTPase	guanosine trifosfato hidrolase
IDP	Imunodeficiências Primárias
ITU	infecções do trato urinário
LPS	lipopolissacarídeo
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>messenger RNA</i>
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NBT	do inglês <i>nitroblue tetrazolium</i>
NOS	enzima sintetizadora de óxido nítrico, do inglês <i>nitric oxide synthase</i>

NOX2	oxidase dos neutrófilos 2
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular pathern</i>
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered</i> saline
PE	ficoetrina
PMA	acetato de forbol miristato, do inglês <i>phorbol-myristate-acetate</i>
Rac-GTP	subfamília de proteínas da família Rho GTPasa
RNA	ácido ribonucléico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SOD	superóxido dismutase
TAE	tris-acetato-EDTA
TLR	do inglês <i>Toll-like receptor (TLR5/TLR9)</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>

LISTA DE FÓRMULAS

H_2O_2 peróxido de hidrogênio

HOCl ácido hipocloroso

NO óxido nítrico

NO_3^- nitrito

$\text{O}_2^{\cdot-}$ ânion superóxido

$\text{OH}^{\cdot}$ radical hidroxila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Conceito e Classificação da Doença Granulomatosa Crônica (DGC)	16
1.1.1 Mutações na DGC ligada ao X	17
1.1.1.1 DGC em genótipos portadores	21
1.1.2 Mutações na DGC autossômica	20
1.2 Objetivos	20
1.2.1 Objetivo geral	21
1.2.2 Objetivos específicos	21
1.3 Hipótese	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Fisiopatologia da DGC	23
2.1.1 O sistema NADPH oxidase	23
2.1.2 A explosão respiratória	24
2.1.3 Defeitos bioquímicos na DGC	25
2.1.4 Correlação genótipo- fenótipo na DGC	26
2.1.5 Herança na DGC ligada ao X	27
2.1.6 Manifestacoes clínicas na DGC	28
2.2 Diagnóstico da DGC	30
2.3 Tratamento da DGC	31
2.4 Transplante de medula na DGC	32
2.5 Terapia gênica na DGC	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Características clínicas dos pacientes DGC	35
3.2 Condições das amostras	35
3.3 Avaliação da explosão respiratória por DHR	36
3.4 Expressão proteica dos componentes do sistema NADPH oxidase	37
3.4.1 Marcação extracelular	37
3.4.4 Marcação Intracelular	37
3.5 Caracterização genético-molecular dos pacientes DGC	38
3.5.1 Extração de DNAg	38

3.5.2 Amplificação dos exons-PCR.....	39
3.5.3 Sequenciamento	41
4 RESULTADOS	42
4.1 Análises clínicas.....	42
4.2 Testes bioquímicos	49
4.2.1 Análise da explosão respiratória pelo teste de DHR.....	49
4.3 Análise estatística	52
4.4 Expressão das proteínas do sistema NADPH oxidase	52
4.5 Análise genético-molecular	56
4.6 Casuística.....	56
4.6.1 Mutações na DGC autossômica.....	56
4.6.2 Mutações na DGC ligada ao X.....	56
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A - Termo de consentimento livre esclarecido.....	79
ANEXO B - Ficha clínica.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conceito e Classificação da Doença Granulomatosa Crônica (DGC)

A DGC foi descrita como uma entidade clínica em 1957 que acometia crianças do sexo masculino com pneumonia, linfadenite e abscessos localizados em diferentes áreas ¹⁻³. Caracteriza-se clinicamente como imunodeficiência grave e rara com uma incidência de 1:200.000 nascidos vivos por ano, nos Estados Unidos ⁴. Em outros países a incidência varia conforme a consanguinidade ^{5 6}, apresentando uma coorte italiana a menor incidência registrada (1:1.000.000) ⁷ enquanto os árabes israelitas (1:111.000) e judeus israelitas (1:218.000) exibiram a maior incidência ⁵.

O defeito molecular da DGC reside na ausência, baixa expressão ou mau funcionamento de um dos componentes do sistema NADPH oxidase. Assim, na forma ligada ao sexo, é afetada a cadeia pesada do citocromo *b*₅₅₈, no caso, o componente gp91-phox, também chamado de NOX2 (70% dos casos) codificado pelo gene *CYBB* que se encontra no cromossomo X. Nas formas autossômicas recessivas é afetado um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, sendo a p47-phox codificada pelo gene *NCF1*, ou p67-phox codificada pelo gene *NCF2* (respectivamente 20% e 6% dos casos); ou ainda a cadeia leve do citocromo *b*₅₅₈, o componente p22-phox (6% dos casos) ⁸⁻¹². Até o momento foi descrita uma mutação num paciente com DGC secundária a defeito no componente Rac2 ¹³ e uma mutação na p40-phox de outro paciente com defeito na explosão respiratória ¹⁴.

Com base nestes dados, a classificação atual da DGC baseia-se nos defeitos moleculares específicos ^{12, 15-22}. 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 X91⁰ 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 além da 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. 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)^{19, 23-27}.

Dentre os defeitos genéticos de pacientes com DGC, ocorrem deleções, inserções e substituições. A diversidade destas mutações e os múltiplos genes afetados constituem uma explicação para a heterogeneidade clínica e genética da DGC^{25, 26, 28-34}.

1.1.1 Mutações na DGC ligada ao X

O gene *CYBB*, o qual codifica a grande subunidade glicosilada do citocromo *b*₂₄₅, denominado gp91-phox, contém 13 exons e ocupa aproximadamente 30 kb da região Xp21.1 do cromossomo X³⁵. Diversos defeitos moleculares que levam a DGC ligada X foram identificados na região codante, introns e raramente nas regiões 5' reguladoras do gene *CYBB*.

Os tipos de mutações que causam DGC ligada ao X 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^{16, 31, 33, 36-40 41}.

Entretanto, numa minoria de casos, tais mutações levam ao fenótipo X91⁻, devido à manutenção parcial do *splicing* normal¹⁹. Vários estudos mostram que as mutações se distribuem com frequência similar entre os exons e as bordas dos genes^{4, 12, 16, 19, 25, 34, 36}. Até o momento foram publicados três trabalhos consecutivos atualizando e descrevendo as mutações na DGC ligada ao X, no qual se detalham 681 mutações do tipo *missense*, *nonsense*, deleções, inserções e defeitos de *splicing* especificamente definidos⁴¹.

1.1.1.1 DGC em genótipos portadores

As mães dos pacientes afetados pela DGC têm sido consideradas muito tempo como indivíduos não afetados pelo fenótipo característico da doença, diversos estudos examinaram as manifestações clínicas dos pacientes femininos portadores, concluindo que a única cópia afetada do cromossomo X presente nas células, pode ser inativado aleatoriamente no desenvolvimento embrionário segundo a hipótese de Lyon ^{42, 43} provocando que as células precursoras hematopoiéticas originem dois tipos de populações diferentes. Uma das populações exibirá uma explosão respiratória normal e a outra população apresentará produção de reativos de oxigênio reduzida ⁴⁴. No diagnóstico bioquímico da doença, a técnica de DHR permite geralmente distinguir as duas populações por meio dos picos de fluorescência observados por meio da técnica de citometria de fluxo ⁴⁵.

O fenótipo das pacientes varia entre diferentes manifestações de abscessos de pele e principalmente *rash* facial relacionado ao lúpus eritematoso discoide assim como as erupções foto sensitivas ⁴⁶⁻⁴⁹. Por outra parte, foram descritos numerosos casos de manifestações gastrointestinais associadas à doença de Crohn assim como colite e pólipos ^{48,49}. A auto-imunidade é reconhecida entre as imunodeficiências primárias e a DGC não se apresenta como exceção, a poliartritis, úlcera aftosa e o fenômeno de Raynaud tem sido reportado nas pacientes portadoras ⁴⁹⁻⁵².

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. 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 ^{19, 25, 53}.

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) ⁵⁴. 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 *b₅₅₈* ⁵⁵.

As mutações que levam a DGC autossômica por defeitos na p47-phox têm sido um desafio 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 ^{52, 56-59}. 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*, parte do genoma de indivíduos sadios, e que a DGC autossômica por defeito da p47-phox se deve à recombinação entre o gene *NCF1* e o pseudogenes relacionados *NCF1B* e *NCF2B* ⁶⁰.

Recentemente, foram também descritos casos de DGC secundários a defeitos na p47-phox, por mutações não relacionadas ao pseudogene ⁶¹. 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 ⁶². 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 sadios e pacientes DGC A47°. Por meio do método de *scan-gene* ⁶³ 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 que indicaria os portadores neste método é 5:1, encontraram também razão

do tipo 2:1, semelhante aos indivíduos sadios, mostrando complexidade em se avaliar indivíduos portadores da deleção GT no exon 2 do gene *NCF1* (Figura 1).

Figura 1. Modelo do possível mecanismo de entrecruzamento e haplótipos resultantes do gene *NCF1*, inclusive o alelo prevalente A47° na DGC.

Fonte: Heyworth et al., 2002.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

- Analisar aspectos clínicos e identificar as alterações genético-moleculares de pacientes brasileiros com DGC.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterização clínica e bioquímica dos pacientes com DGC.

- b) Identificação do componente defeituoso nos leucócitos de pacientes com DGC.
- c) Análise da expressão protéica do sistema NADPH dos pacientes DGC.
- d) Identificação da mutação específica no gene alterado, por meio de sequenciamento direto do DNAg amplificado.

1.3 Justificativa

Apesar da intensa investigação clínica, bioquímica e molecular, ainda existem muitas lacunas no conhecimento sobre os defeitos genético-moleculares e sua correlação com os diferentes fenótipos da Doença Granulomatosa Crônica (DGC). Porém, a importância de uma avaliação genética e sua correlação com a clínica é cada vez mais evidente e nos mostra um caminho novo para futuros estudos da DGC e outras imunodeficiências.

Identificar o componente alterado e a mutação subjacente que leva às variadas manifestações clínicas é muito importante, pois cada paciente com DGC e sua família têm potencialmente um defeito molecular específico. Isto é essencial para o aconselhamento genético adequado, terapêutica precoce e prevenção de sequelas.

Esta proposta continua a linha de investigação do nosso laboratório, sobre desenvolvimento e regulação do sistema NADPH oxidase fagocítico humano. Considerando que nosso objeto de estudo é o paciente, é fundamental sua caracterização fenotípica e genotípica, antes da instalação de perguntas científicas de vanguarda e para tal, projetos como esse são fundamentais para o progresso dos trabalhos de nosso grupo de pesquisa.

1.4 Hipótese

Hipotetizamos que podemos desvendar novos fenótipos e genótipos de DGC em nosso meio ambiente.

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 Fisiopatologia da DGC

2.1.1 O sistema NADPH oxidase

É um sistema catalisador da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio (O_2) molecular gerando a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o precursor peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras espécies reativas do oxigênio necessárias para a função microbicida. O complexo ativo consiste em 5 subunidades protéicas e a pequena molécula Rac com atividade GTPase. A função catalítica consiste em dois pequenos complexos que se encontram dissociados nas células fagocíticas inativas, o complexo formado por duas subunidades transmembranas, gp91-phox também citada como NOX2, e a proteína p22-phox, formam parte de um heterodímero conhecido como Flavocitocromo b_{558} achado em vesículas e membrana plasmática de neutrófilos, monócitos e outros leucócitos. Em resposta a diferentes estímulos como a presença de microrganismos as subunidades reguladoras p47-phox, p67-phox e p40-phox que coexistem formando um complexo no citosol se translocam com Rac-GTP na membrana, esta união física das proteínas p67-phox e gp91-phox formam o domínio catalítico responsável pela ativação do complexo (Figura 2).

Figura 2. Componentes protéicos do sistema NADPH oxidase e genes que os codificam.

Fonte: Lambeth et al., 2004.

2.1.2 A explosão respiratória

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^{21, 26, 64, 65}.

A explosão respiratória comprometida na DGC é um importante componente do sistema imunológico inato. O ânion superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima superóxido dismutase (SOD). A enzima mieloperoxidase (MP) atua sobre esse composto, transformando-o em ácido hipocloroso (HClO), um potente microbicida. Embora inativado nas células em repouso, esse processo é rapidamente ativado por estímulos inflamatórios e fisiológicos, tais como a fagocitose^{55, 66-68} (Figura 3).

Figura 3. Esquema representativo da produção de espécies reativas de oxigênio pelo fagolisossomo nos fagócitos.

Fonte: Winterbourn, 2008.

2.1.3 Defeitos bioquímicos na DGC

Historicamente tem sido bem reconhecido as mutações no gene *CYBB*, causadas pela DGC ligada ao X, acometem aos pacientes com fenótipos mais graves que os apresentados por fenótipos com mutações no na DGC autossômica sugerindo que esta última têm evolução mais benigna atribuída a atividade NADPH oxidase residual ⁴. No geral os casos de DGC autossômica que afetam as proteínas p22-phox e p67-phox são tão graves quanto os casos de DGC ligada ao X gp91-phox. Espera-se que pacientes com o fenótipo X91⁻, com atividade NADPH oxidase residual de 3-30% tenham evolução mais benigna do que aqueles com fenótipos X91^o ^{25, 33}. Recentemente, mostraram que pacientes com doença granulomatosa

crônica com produção residual de ROI apresentam menor gravidade e maior probabilidade de sobrevivência em longo prazo do que pacientes com menor produção de ROI residual ²⁷.

Foi demonstrado que a função oxidase dos fagócitos se encontra influenciadas pelo pH fagossomal afetando a atividade microbicida mediada por grânulos o que ajuda a explicar o espectro microbiano de infecções na DGC. Por exemplo, *S. aureus*, *S. marcescens*, *S. asteróides* e *A. fumigatus* exigem pH neutro e são resistentes a pH ácido encontrado no fagossomos de neutrófilos DGC. Considerando que *C. albicans* pode ser um agente patogênico incomum na CGD porque é suscetível a atividade microbicida não oxidativa em pH ácido encontrado no fagossoma de neutrófilo de DGC ⁶⁹. Além disso, estudos revelaram que a produção de fagócitos de espécies reativas de oxigênio leva a atividade microbiana através da ativação de certas proteínas de grânulos primários dentro de vacúolos fagocitário o que sugere que as espécies reativas de oxigênio também agem como moléculas de sinalização intracelular ⁷⁰.

2.1.4 Correlação genótipo- fenótipo na DGC

Recentemente uma revisão da literatura, relaciona todas as mutações do tipo *nonsense* do gene *CYBB* como altamente deletérias, Por outra parte as mutações *missense* que afetam os aminoácidos desde a posição 1 a 309 da proteína gp91-phox foram associadas com a produção residual de superóxido com bom prognóstico a exceção da mutação que codifica o aminoácido histidina na posição 222 a qual apresenta uma produção de superóxido nula provocando um fenótipo deletério ⁷¹.

Os resíduos de aminoácidos presentes na posição 310 em diante afetam os domínios de união dos domínios FAD (*flavin adenine dinucleotide*) e NADPH essenciais para a função do sistema produtor de espécies reativas de oxigênio, quando a mutação permite a expressão da proteína, esta se apresenta como não funcional estreitamente associada a consequências danosas em pacientes masculinos. Os fenótipos causados por mutações *missense* no gene *CYBB* com produção residual de ROS são descritas como variantes hipomórficas da DGC,

caracterizadas pelo início tardio das manifestações assim como pelo curso menos nocivo da doença e uma melhor sobrevivência do paciente, como sucede no caso das mutações no gene *CYBA*, *NCF1* e *NCF2*. Contrariamente a esses resultados a produção reduzida de ROS foi observada em pacientes portadores de mutações do tipo *nonsense*, *frameshift*, de *splicing* e deleções ²⁷.

2.1.5 Herança na DGC ligada ao X

O tipo de DGC ligada ao X se apresentará no caso de mães portadoras afetando 50% da descendência feminina portadora do cromossomo X embora o total da descendência masculina padeça a doença. Enquanto o total da descendência feminina dos pais portadores possuirá o cromossomo mutado e, porém da doença, embora o total da descendência masculina se apresente como sadia sem risco nenhum do fenótipo DGC (Figura 4).

Figura 4. Esquema representativo do modo de herança genética da DGC ligada ao cromossomo X. **A.** Herança em mães portadoras. **B.** Herança em pais afetados.

U.S National Library of medicine. NIH.

2.1.6 Manifestações clínicas na DGC

A DGC caracteriza-se por infecções bacterianas e fúngicas recorrentes de início precoce, assim como uma resposta inflamatória desregulada que resulta na formação de granulomas e diversas doenças inflamatórias. As lesões granulomatosas são usualmente as primeiras manifestações da doença em sítios frequentes como pulmão, linfonodos e fígado. Os tipos de infecções incluem pneumonia, abscessos, osteomielite, adenites e celulites. Os abscessos se apresentam geralmente em áreas perianais, periretais assim como no fígado⁷¹.

A ocorrência de infecções por bactérias catalase positivas como *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Nocardia sp* e *Serratia Marcescens*

são comuns em pacientes com DGC ^{72, 73}. Em norte América a maiorias das infecções são causadas por esses organismos, embora em outros países infecções por *Salmonella* e o bacilo Calmette-Guerin são comuns ²⁰. É bem documentada a associação de complicações infecciosas pelo Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) com imunodeficiências primárias, sendo este o evento desencadeante da pesquisa de alterações imunológicas em alguns pacientes com diagnóstico de DGC ^{74, 75}.

As bactérias gram negativas como os complexos *B. cepacia* são causas comuns de pneumonia e raramente de sepsis assim como *B. gladioli* ^{4, 25}. Por outra parte espécies como *Chromobacterium violaceum* e *Francisella philomiragia* são conhecidas como causantes de sepse no golfo de México e nos Estados Unidos respectivamente ^{76,77}. Recentemente, um novo organismo foi reconhecido exclusivamente em casos DGC, *Granulibacter bethesdensis* foi isolado como agente patogênico provocante de linfadenite e sepse em lugares como Estados Unidos, Panamá e Espanha sugerindo uma distribuição ambiental ^{78, 79}.

Infecções por *Streptococcus sp* são raras nos casos de DGC devido a natureza “catalase negativa” dos microrganismos, não obstante a literatura associa as espécies *Streptococcus intermedius* e *Hemophilus paraphropilus* com a formação de abscessos em pacientes portadores da doença ⁸⁰⁻⁸².

Infecções fúngicas invasivas por *Candida sp*, *Paecilomyces sp* e principalmente *Aspergillus sp* agem como um dos principais causadores de infecções pulmonares e tende a invadir os tecidos adjacentes e os ossos da cavidade torácica ^{83,84}. Consequentemente, os pacientes apresentam infecções graves e recidivantes na pele, vias respiratórias, trato gastrointestinais, e respectivos linfonodos que drenam essas áreas. Outros alvos de infecções são o fígado, ossos, sistema nervoso central e pâncreas ^{4, 13, 20, 33, 34, 85, 86}.

Bem caracterizadas são as infecções pelo o gênero *Aspergillus* ⁸⁷ sendo *A. fumigatus* a mais comum e *A. nidulans* a espécie recentemente descrita como exclusiva de DGC ⁸⁸ os sintomas derivam em pneumonia disseminando-se rapidamente nas costelas e coluna causando osteomielite ou provocando severos danos no cérebro no caso do *A. nidulans* ⁷¹.

2.2 Diagnóstico de DGC

Diversos métodos bioquímicos são utilizados para o diagnóstico de pacientes com DGC, o mais conhecido é o teste do NBT (*nitro blue tetrazolium*) que se baseia na liberação de superóxido pelos leucócitos e redução do NBT originando um depósito de formazan no interior das células ⁸⁹. O teste é realizado imediatamente após a coleta de sangue sobre lâmina de vidro previamente incubada a 37 °C por 30 minutos, para cada paciente deve ser montada uma lâmina para análise das células em repouso, sobre a qual é adicionado o corante NBT e PBS (1 mg/ml) acrescido com DMSO (dimetilsulfóxido, 1 µl/ml). O exame é avaliado simultaneamente com outra lâmina na qual as células foram estimuladas com acetato de PMA (Forbol-miristato-acetato, 1 µg/ml) e uma lamina controle. Mais de 95% de 200 neutrófilos normais estimulados com PMA devem ser capazes de reduzir o NBT. Devido ao teste ser qualitativo, este pode ser interpretado falsamente como normal nos casos de mães portadoras de DGC ou paciente com variantes hipomórficas da doença ⁷¹.

O teste baseado na redução de citocromo c é utilizado como um método quantitativo para dosar a liberação de superóxido pelos granulócitos e leucócitos mononucleares, fracionados do sangue periférico por meio de centrifugação em gradiente de densidades (Sigma Histopaque 1.077 g/ml e 1.119 g/ml, St. Louis, EUA) ⁹⁰. A liberação de superóxido é determinada em espectrofotômetro por meio da redução do citocromo c especificamente inibida pela superóxido dismutase (SOD)⁹¹, ⁹² conforme ao ensaio publicado anteriormente por nosso grupo^{93, 94}. O teste oferece uma ótima opção no diagnóstico DGC embora o trabalho com crianças com a saúde comprometida dificulte a coleta de sangue suficiente para obter resultados confiáveis e completos.

Finalmente, a técnica atualmente utilizada no diagnóstico de DGC é a avaliação semi quantitativa da explosão respiratória, por meio da molécula fluorescente de DHR (Dihidro-rodamina) que uma vez reduzida em *rhodamine* -123, é excitável por um comprimento de onda de 488 nm emitindo uma fluorescência de 515 nm analisada por citometria de fluxo ⁹⁵. O método permite a detecção de portadoras sãs, dirigindo a investigação molecular nos casos ligados ao X. Pode ser

realizado com uma pequena amostra de sangue o que permite que seja determinado de maneira rápida e confiável^{96, 97}.

2.3 Tratamento profilático da DGC

Os cuidados profiláticos são de extrema importância para os indivíduos com DGC. Estes cuidados incluem a prevenção das infecções por meio de imunizações e remoção das fontes de patógenos; o uso de antibiótico profilático assim como o uso de interferon gama humano recombinante. Todos os pacientes devem receber as imunizações de rotina, bem como a vacina anual contra influenza. Vacinas contendo microrganismos vivos atenuados, como a BCG, são contra-indicadas, devido ao risco de reações adversas graves e potencialmente fatais em imunodeficientes⁵³.

Assim como o uso profilático de antibióticos com penetração intracelular como o trimetoprin-sulfametoxazole (5 mg/kg/dia) reduzindo a frequência das infecções bacterianas por 1 a 3,5 anos, principalmente àquelas de origem estafilococal, diminuindo também a frequência de infecções fúngicas^{26, 98}. O uso de azoles como antifúngicos tem reduzido consideravelmente a frequência e a severidade de infecções fúngicas. A profilaxis com itraconazole tem sido altamente recomendada, no caso de pacientes com dificuldades na tolerância do medicamento e recomendado o uso de posaconazole (200 mg/kg/dia)^{99, 100}.

Além disso, o uso profilático de citocinas, como o IFN- γ , forma parte do regime na maioria dos centros de Estado Unidos. O IFN- γ (50 mcg/ m²) possui a capacidade efetiva de ativar a explosão respiratória dos fagócitos estimulando a liberação de superóxido, sendo assim um excelente terapêutico para tratamento da DGC. O mecanismo de correção parcial no sistema oxidativo e na função microbicida tem sido demonstrado em diversos estudos, tanto *in vitro* como *en vivo*¹⁰¹. Nosso grupo demonstrou a eficiência do tratamento com IFN- γ na fidelidade do mecanismo de *splicing* e a estabilidade dos transcritos do gene *CYBB*, corrigindo parcialmente a expressão do componente gp91-phox, atenuando o fenótipo de DGC ligada ao sexo em uma família especialmente responsável ao tratamento com IFN- γ ^{101, 102}.

O uso precoce de drenagem cirúrgica, ou ressecção de focos infecciosos persistentes, é incluído entre os requisitos centrais para o tratamento da DGC. É conhecida a vital importância da intervenção precoce nas infecções, antes que elas comprometam o sistema imunológico do paciente com DGC ^{26, 66}.

2.4 Transplante de medula óssea na DGC

Dentre as perspectivas de cura, pese a dificuldade imposta pela heterogeneidade das mutações que levam ao fenótipo de DGC, o transplante de células mães hematopoiética (HSCT, Hematopoietic stem cell transplantation) tanto de doadores hematopoieticamente compatíveis como com doadores não compatíveis tem sido uma opção bem sucedida ao longo dos anos em diversas imunodeficiências como a síndrome de Wiskott-Aldrich e a imunodeficiência combinada grave ^{103, 104}. Na DGC o estabelecimento de condições mieloablativas e outros avanços após o ano 1985 tem sido promissor para o transplante de células mães na doença. O uso de imunossupressores como o busulfan (Bu) (4 mg/ kg/ dia) oralmente ou por via intravenosa (3,6 mg/kg/dia) durante 4 dias assim como o uso de ciclofosfamida (Cy) (50 mg/kg/dia) e globulina de coelho antitimocitos ou tanto a fludarabine (Flu), melfalan (Mel) ou treosulfan (Treo) são amplamente utilizados em diversos países ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

A primeira grande serie de transplantes, envolveu 7 pacientes em diferentes centros europeus no período de 1985-2000, em cujo estudo 25 pacientes DGC receberam transplante de doadores compatíveis e somente 2 de doadores não relacionados, no caso 23 (85%) deles sobreviveram, 2 apresentara rejeição do enxerto e 3 síndromes de enxerto versus hospedeiro ¹⁰⁸. No período de 1998-2007 um grupo de Grã Bretanha publicou estudos em 20 pacientes, 10 deles receberam enxertos não compatíveis e a outra metade foram transplantados com enxertos compatíveis, 18 deles sobreviveram (90%) e 2 morreram por infecções fúngicas, todos eles receberam condicionamento mieloablativo ¹⁰⁹. Em Alemanha foram reportado em 2009, 12 casos no qual 9 deles foram transplantados com enxertos não compatíveis, todos eles sobreviveram e a maior parte deles receberam condicionamento com Bu/Cy coincidentemente com 12 casos no qual 6 foram

transplantados com doadores não relacionados e os restantes 6 com sangue de cordão umbilical todos eles condicionados com sucesso ^{110, 111}.

2.5 Terapia gênica na DGC

Há duas décadas que a terapia gênica é usada como uma alternativa promissora no tratamento das imunodeficiências primária, o uso de vetores virais integrados tem demonstrado incríveis progressos nas correções de desordens monogênicos, não obstante, a transferência gênica tenha sido associada em alguns casos a leucemia devido à inserção de vetores, os sérios eventos enfatizam a necessidade de novas pesquisas na área com o objetivo de lograr métodos seguros de tratamento.

Os primeiros estudos na área foram realizados em meados dos anos 1990, conduzidos no National Institute of Health (NIH), no caso 5 pacientes com DGC autossômica recessiva foram transfundidos com células de sangue periférico CD34⁺ junto ao fator estimulante de colônia de granulócitos (GCSF, *granulocyte colony-stimulating factor*) a modificação genética das células foi realizada com o vetor retroviral Ψ expressando o gene codificante da proteína p47-phox. Após transdução, as células ($0,1 - 4,7 \times 10^6$ cel/kg) foram reinfundidas no paciente sem mielossupressão, com uma eficiência de tradução *in vitro* de 21-90% contrariamente ao observado *in vivo* cuja eficiência foi de 0,004 - 0,05% ¹¹². O mesmo grupo de pesquisa continuou investigações similares no ano 1998 utilizando dessa vez, além do GCSF, ligando de Flt3 (50 ug/kg) com numerosas mudanças no protocolo, no obstante, as células corrigidas após 4 semanas foram somente de 0,2-0,6%.

Estudos semelhantes foram realizados na Universidade de Indiana, onde as células foram transduzidas usando o vetor Ψ retroviral bicistronico contendo também genes resistentes a neomicina ¹¹³. O denominador comum em todos os casos foi à falta de condicionamento da medula óssea ou de mielosupresao, usualmente utilizada nos transplantes alogênicos. Atualmente se conhece que o inserto num número suficiente de células é possível proporcionado o condicionamento da medula óssea ou com a co-expressão de um a gene marcador para a seleção das células *in vivo* ¹⁰⁸.

Até o ano 2010 inúmeros estudos foram realizados como se detalham na tabela I. O mais exitoso deles foi realizado no National Institute of Health (NIH) no qual foi utilizado um vetor Ψ retroviral - MFGS introduzido com o DNA complementar para o gene codificante da proteína gp91 *phox*, no caso, os pacientes após infusão de células foram tratados como busulfan (10 mg/kg) ¹¹⁴.

Por outro lado, estudos realizados em Frankfurt no Instituto Georg- Speyer-Haus, usando também um vetor retroviral (SF71-GP91-phox) sob o controle transcricional de um vírus de repetição terminal comprida (LTR, *long terminal repeat*) apresentando uma eficiência de tradução de 40-45% com um 65-95% das células expressando CD34 até o dia quinto da tradução, no caso o paciente foi tratado com busulfan liposomal e apresentou uma expressão de gp91-phox em 15% das células de sangue periférica o qual aumentou devido à ativação insercional de genes promotores de crescimento como PRDM16 e MDS1/EVI1. A sobre-expressão de EVI1 provocou o desenvolvimento de uma síndrome mielodisplásica com monossomia 7 observado nos dois pacientes tratados ^{115, 116}. Recentemente, o mesmo grupo demonstrou a avaliação de um vetor retroviral inativado por se mesmo (SIN, *self-inactivating*) de replicação deficiente com um sistema de agregação dividida. A análise no site de integração revelou que a infecção com o vírus de sarcoma aviário e o vírus da leucemia (ASLV, *Avian Sarcoma Leucosis Virus*) uma subfamília retroviral, resulta num padrão de integração relativamente neutra em comparação aos vetores lenti e gamaretrovirais anteriormente estudados ^{117, 118}.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização clínica e bioquímica dos pacientes DGC

No primeiro semestre iniciamos o recrutamento de pacientes com suspeita de DGC encaminhados ao Laboratório de Imunologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, conforme protocolo de cooperação estabelecida com o Grupo Brasileiro de Imunodeficiências aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os procedimentos foram realizados após leitura e concordância com os termos do Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) de crianças e adultos envolvidos no estudo (ANEXO A).

Foram utilizados como critérios de inclusão clínica, os pacientes com infecções graves e recorrentes nos primeiros anos de vida como pneumonia, infecções de pele, linfadenite, colite, sepse dentre outras, no decorrer da infância e/ou como um histórico familiar sugestivo de imunodeficiência. Os pacientes foram derivados pelos médicos pertinentes junto à ficha clínica fornecida por nosso grupo de pesquisa (ANEXO B).

Dentro dos critérios de exclusão foram considerados os eventos de infecção ativa e/ou neoplasia, insuficiência renal ou hepática, pacientes imunocomprometidos como os portadores do vírus HIV ou tratados com corticosteróides; além daqueles com diagnóstico laboratorial incidental de IDP com predominância de defeitos de anticorpos, sem história de infecções de repetição severas.

3.2 Condições das amostras

Foram utilizados 3 ml de sangue periférico total, devido a necessidade de que as células se encontrem nas condições ótimas para serem avaliadas sem a intervenção de componentes quelantes de cálcio as amostras foram conservadas em heparina sódica para serem avaliadas nos testes bioquímicos.

Para a avaliação do perfil genético desses pacientes, foram colhidos 5 ml de sangue periférico total, conservados em EDTA. O mesmo critério foi aplicado para os pacientes adultos e controles não parente.

As amostras foram conservadas sob agitação, a temperatura ambiente.

3.3 Avaliações da explosão respiratória por DHR (Dihidro-rodamina)

Por meio da conversão da molécula não fluorescente (DHR-123) em molécula fluorescente (*rhodamine-123*) analisamos a explosão respiratória dos monócitos e neutrófilos. A DHR-123 penetra nas células e na presença de H_2O_2 é oxidada convertendo-se em *rhodamine-123*, composto químico excitável a um comprimento de onda de 488 nm, emissor de fluorescência a 515 nm (13) e detectável por citometria de fluxo no FACs Calibur (BD, Columbia, MD, EUA).

Para esta análise, foram utilizados 3 tubos de FACs com suas respectivas duplicatas, contendo 150 μ l de sangue em heparina, rotulados como não marcado com DHR (NM), espontâneo (ESP) e estimulado (PMA). A seguir foram adicionados 2 ml de solução de lise de hemácias (RBC) em cada tubo e foram incubados à 37 °C em estufa de CO_2 por 10 minutos, seguida da centrifugação a 1800 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao tubo contendo o *pellet* foram adicionados 100 μ l de PBS, os tubos rotulado como “estimulado” foi incubado com 4,5 μ l de PMA (90 ng/ml) para ativação celular durante 30 minutos à 37 °C em estufa de CO_2 . Foram adicionado 4 μ l de DHR em todos os tubos, a exceção dos nominados “não marcados”, e posteriormente incubados na estufa de CO_2 por 10 minutos. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 500 μ l PBS e centrifugadas a 1800 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* suspenso em 400 μ l PBS para a posterior análise por citometria de fluxo realizando-se *gates* nas populações de neutrófilos e monócitos utilizando como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC).

Todos os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência (MFI) em escala logarítmica tanto para a população de monócitos como de granulócitos analisados por meio de citometria de fluxo.

3.4 Expressão protéica de componentes do sistema NADPH oxidase

3.4.1 *Marcação extracelular*

A avaliação dos componentes protéicos de membrana do sistema NADPH oxidase, tanto para as proteínas de membrana (gp91-phox e p22-phox) como para as proteínas citosólicas (p40-phox, p47-phox e p67-phox) foi realizada com 100 µl de sangue total em tubos de FACS e posteriormente incubadas com solução de lise de hemácias RBC (QUIAGEN sciences, Maryland, EUA) por 6 minutos a 37 °C na estufa de CO₂ e a continuação são lavadas com 500 µl de PBS e centrifugadas a 2500 rpm durante 6 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente com pipeta, no caso dos tubos destinados a marcação de membrana, 50 µl de PBS foram adicionados junto aos anticorpos específicos e incubados a 4 °C por 30 minutos. Foram realizadas duas lavagens com PBS, alternando novamente com centrifugações a 2500 rpm durante 6 minutos, finalmente se fixaram as amostras com 250 µl de paraformaldéido 1 % e analisada no FACS (Canto II, BD, Columbia, MD, EUA).

3.4.2 *Marcação intracelular*

A marcação intracelular, também foi realizada como 100 µl de amostra, incubada com solução de lise de hemácias e lavada com PBS seguida de centrifugação. Uma vez descartado o sobrenadante foram adicionados 50 µl de buffer de fixação Cytofix/Cytoperm (BD, Columbia, MD, EUA) em cada tubo e incubados a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foram feitas duas lavagens com PBS acrescentados com 50 µl de solução permeabilizadora Phosflow III (BD, Columbia, MD, EUA) e incubadas a 4 °C por 40 minutos. Depois de duas lavagens alternando com as centrifugações a 2500 rpm de 6 minutos as amostras foram ressuspensas em 50 µl de PBS e os anticorpos específicos foram adicionados e incubados a 4 °C por 30 minutos. Após as duas lavagens com PBS, as amostras foram fixadas com 250 µl de paraformaldeído e lidas no citômetro de fluxo (Canto II, BD, Columbia, MD, EUA).

Na tabela 1 se detalham os anticorpos e as conjugações assim como os respectivos fluorocromos.

Tabela 1. Anticorpos monoclonais e fluorocromos utilizados na marcação intra e extracelular de proteínas (*PE*, ficoeritrina; *FITC*, isicianato de fluoresceína; *PE-Cy5* ficoeritrina-Cy5).

	Membrana				Citoplasma	
Anticorpos	Anti- <i>gp91phox</i>	Anti- <i>cit 558</i>	Anti- <i>p22phox</i>	Anti- <i>p40phox</i>	Anti- <i>p47phox</i>	Anti- <i>p67phox</i>
Fluorocromos	FITC	FITC	PE	FITC	PE	PE-Cy5

3.5 Caracterização genético-molecular dos pacientes DGC

3.5.1 Extração de DNAg

As amostras de DNA genómico (DNAg) foram extraídas de sangue periférico, usando um kit de extração Wizard®Genomic DNA purification (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Em tubos falcon de 15 ml, contendo 3 ml de sangue, foram adicionados 9 ml de solução de lise celular misturando-se o conteúdo do tubo por inversão. A seguir, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugadas a 15000 x g durante 30 segundos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 3 ml de solução de lise nucléica e 1ml de solução para precipitação protéica. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 ml. O DNAg foi precipitado em 3 ml de isopropanol absoluto e a amostra centrifugada a 2000 x g durante um minuto. Após descartar o sobrenadante, o DNAg foi lavado com 3 ml de etanol (70%) e centrifugados novamente. A seguir, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente para a evaporação do etanol

residual. O DNAg foi reidratado em 250 µl de solução de reidratação e incubado *overnight* a 4 °C. Após esta etapa, o DNA foi armazenado a – 20 °C até a sua utilização.

A quantidade e qualidade do DNAg foram aferidas por meio do espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm e 260 nm, utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, NY, EUA). Após a leitura no espectrofotômetro, a integridade do DNAg foi analisada por eletroforese em gel de agarose (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) 1,5 % em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) corados com SYBR® Green II RNA *stain* (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) sendo comparada com um padrão de massa molecular de 100pb (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA).

3.5.2 Amplificação dos Exons – PCR

As reações de PCR foram realizadas num volume de 50 µl contendo 50 ng de DNAg, 0,3 µM de cada oligonucleotídeo, 250 µM de dNTPs, 0,5 unidades de enzima recombinante Taq DNA polimerase e 2,5 µL do buffer de x 10 PCR (10 mM tris-HCl, 50 mM KCl), em 2 mM Cl₂, fornecidas pelo fabricante (Invitrogen). A amplificação foi executada num sistema de Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Os oligonucleotídeos para amplificação do DNAg do exon 2 da proteína p47-phox, dos 13 exons dos genes que codificam as proteínas gp91-phox foram desenhados de acordo com as sequências descritas previamente^{31, 119} e detalhadas na tabela 2.

Tabela 2. Detalhe das sequências de oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos genes *NCF1* e *CYBB* (F: *forward*; R: *reverse*).

<i>NCF1</i>	
2F GTG CAC ACA GCA AAG CCT CT	7F ACA GAA GTA GAA ATT CTC CCT
2R CTA AGG TCC TTC CCA AAG GGT	7R TTC TTG AAC CAA AAC AGC AC
<i>CYBB</i>	
1F GCA AGG CTA TGA ATG CTG TTC	8F CTT GTC AGT ACA GTT CCC CAT
1R GCT TTG GTC TAT TTT AGT TCC	8R GAT GTC CAG AAA GAA CTT GGC
	9F GTA TCC CTT AAT CAG CCC ATC
2F TGT TGA GGA AAG AGC TGG CT	9R CGG TGA CCA CAG AAA TAG CT
2R TAA GTG ACT GTT GCC CAG GA	
	10F AAC CCA ACG TTG GCA CTA AG
3F CAA AGG GTC CTA GCT AGC C	10R CCC TTC ACT AAT AGG CCT AC
3R TAG TTG TCT TAG GGA GCT CC	
	11F GTG AAA TGT CCA GAG CCT TC
4F TAC TGG CTG TTT GAC CTG AG	11R TGG CGA TAC TAA ATG AGA GTG
4R GAA GTG GCA GAA AGT GTG GT	
	12F CGA AGT CTC CCT TTC TAG AC
5F ACA ACT AGA GAG GAT CTT ACCC	12R GGA ATC TTC TGT TGG GCA TG
5R GAG AGG TCT TCA CTC ACT GA	
	13F GCT CAC ACA AAC AGG CTG AA
6F TGT CTG TGA GGG ATG ATT AGG	13R CCA TAG AGC TCC ACA TAA ATG
6R TAG CAA TTA CAT GGG TGC ATG	

As ampliações foram avaliadas por meio de eletroforeses em gel de agarose a 1,5 %. As amostras cujo tamanho da banda coincidia com o exon amplificado e com a bibliografia consultada foram escolhidas e posteriormente purificadas.

Devido ao fato de que, no princípio, a maior parte de nossas amostras foram provenientes de pacientes do sexo feminino, onde geralmente o componente afetado se encontra na p47-phox, nos concentramos inicialmente no exon 2 deste gene, onde efetivamente a maioria das mutações de nossos pacientes foram identificadas.

A seguir foram sequenciadas as amostras obtidas da amplificação dos 13 exons do gene *CYBB* dos pacientes masculinos onde a probabilidade de achar o componente mutado é alta.

3.5.3 Sequenciamento

Após a amplificação dos exons por PCR específico, as amostras de DNAg selecionadas foram purificadas com kit GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e encaminhadas para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (MegaBACE 1000 / DYEnamic ET Dye Terminator Kit com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase).

Para análise dos cromatogramas foram utilizados os software BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html), UCSC Genome Browser Home (www.genome.ucsc.edu/) e Ensemble Genome Browser (www.ensembl.org/index.html). A determinação do efeito da alteração na sequência foi definida por NCBI-BLASTX (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), das sequências possíveis de cada cluster contra o Banco de dados de proteínas NR.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Clínica dos pacientes DGC

Foram encaminhados ao nosso laboratório 54 casos com suspeita clínica de DGC. Deste total foram confirmados 18 casos com diagnóstico de DGC por meio do teste de DHR. Dentre os 16 pacientes cujo histórico clínico foi pesquisado (Figura 5) 8 pacientes (50%) apresentam atualmente idade entre 0 e 3 anos, os outros 8 (50%) possuem entre 7 e 22 anos (Figura 5 **A**) embora a idade de diagnóstico de 8 (50%) deles tenha sido nos primeiros 3 anos de idade, 2 (12%) deles foram diagnosticados entre os 3 e 6 anos, e nos restantes 6 pacientes (38%) o diagnóstico foi realizado entre os 7 e 22 anos de idade (Figura 5 **B**).

Figura 5. Faixa etária dos pacientes com diagnóstico DGC. **A.** Idade atual dos pacientes DGC. **B.** Idade de diagnóstico dos pacientes DGC.

As amostras tiveram diferentes procedências, 7 pacientes foram oriundos do Rio de Janeiro, 5 de São Paulo, dois do Rio Grande do Norte, 1 do Paraná, 1 do Mato Grosso do Sul e 1 do Distrito Federal assim como 1 de Belém de Pará. Os 18 pacientes com diagnóstico bioquímico de DGC apresentaram alta incidência de infecções bacterianas e fúngicas. As fichas clínicas de 16 pacientes, dentro os 18 pacientes revelaram um grande espectro de infecções, assim, 9 pacientes

apresentaram abscessos de pele, 7 apresentaram pneumonia, 5 amigdalite e outras 4 infecções do trato urinário como 4 deles também exibiram osteomielite, as porcentagem das diferentes infecções dos 16 pacientes se podem observar na figura 6.

Figura 6. Infecções recorrentes apresentadas pelos pacientes DGC (N=16).

Dentre os patógenos isolados de 7 pacientes observou-se a espécie oportunista como *Aspergillus fumigatus*, além de infecções bacterianas por *Staphylococcus aureus* e outras gram positivas não especificadas, além da cepa resistente de *S. aureus*, CA-MRSA (Figura 7).

Figura 7. Patógenos isolados dos pacientes DGC (N=7).

Os detalhes dos casos clínicos estudados se exibem na Tabela 3.

Tabela 3. Detalhe das fichas clinica dos pacientes com diagnostico DGC.

Pac.	Primeiras manif. (meses)	Sexo	Idade (meses)	Idade do diagn. (meses)	Retardo diagn. (meses)	Características clínicas	Patógeno isolado
1	7 dias	M	16	6	6	Abscessos de pele e em articulações	<i>S. Aureus</i> <i>Ca-Mrsa</i>
2	6	M	84	72	66	Pneumonia, amigdalite, ITU, diarreia	
3	60	F	84	72	12	Amigdalite, diarreia, ITU	<i>A. fumigatus</i> <i>T. gondii</i>
4	1	F	132	120	119	Pneumonia, abscesso cutâneo, amigdalite, hiperplasia linfóide	
5	5	F	120	130	125	Otite, pneumonia, ITU, diarreia, piodermite	
6	7 dias	F	24	12	12	Pneumonia, ITU, osteomelite, abscessos, sepse	<i>Ca-Mrsa</i>
7	80	F	144	120	40	Otite, Pneumonia, amigdalite, osteomelite, aspergilloma pulmonar	<i>S. aureus</i>
8	9	M	192	168	160	Otite, pneumonia, amigdalite, Piodermite, BCGite	
9	10	M	36	22	12	Abscessos cutâneos, celulite, adenomegalia axilar	
10	180	M	312	270	90	Abscessos, furúnculos, Adenites cervicais	
11	4	M	30	24	20	Infecções de pele	
12	1	M	36	31	30	Pneumonia, otite, celulite, piomiasite	

13	04 dias	M	15	9	9	Piodermite, sepse	<i>S. Aureus</i>
14	60	M	180	170	110	Otite, amigdalite, hiperplasia de linfonodo, osteomielite	<i>S. aureus</i> <i>A. fumigatus</i>
15	Sem ficha clínica						
16	20 dias	F	9	4	3	Pneumonia, hiperplasia de linfonodo, colite, sepse	
17	20 dias	M	7	5	4	Dermatite atópica, otite	Gram +
18	Sem ficha clínica						

Quanto aos 36 pacientes que não foram confirmados como portadores de DGC por meio do teste DHR, 21 deles são meninos e 15 meninas. Do total, 13 deles são provenientes do Estado de São Paulo, 7 do Rio de Janeiro, 3 do Rio Grande do Sul, 4 de Ceará, 3 do Rio Grande do Norte, 3 do Paraná, um da Bahia, 1 de Minas Gerais e finalmente 1 do Piauí.

Nas 22 fichas clínicas disponíveis se observaram infecções recorrentes que se manifestaram como quadros clínicos de pneumonia, infecções de pele, ITU e artrite principalmente.

Enquanto aos patógenos isolados em 8 dos casos, se observou uma grande variedade de espécies como *S. aureus*, *A. fumigatus*, *K. pneumoniae*, *E.coli*, *P. aureoginosa*, *C.albicans* e outras espécies Gram positivas não especificadas, o detalhe dos casos clínicos abordado excluídos de nossa pesquisa se encontram na tabela 4.

Tabela 4. Detalhe das fichas clinica dos pacientes sem diagnostico DGC.

Paciente	Primeiras manif. (meses)	Sexo	Idade	Idade do diag. (meses)	Características clínicas	Patógenos isolado
1	1	F	132	120	Amigdalite, ITU, celulite, artrite	
2	18	F			Pneumonia	
3	130	M	168	100	Pneumonia, artrite, osteomelite, sepse	
4	24	M	120	36	ITU, hepatoesplenomegalia	
5	20	F			Dermatites, otites	
6	12	M	36	27	Otite, dermatite, candidiase bucal	<i>C. albicans</i>
7	28	M	48		ITU, Osteomielite, infecções de pele, artrite	<i>A. fumigatus</i>
8					Sem ficha clinica	
9					Sem ficha clinica	
10					Sem ficha clinica	
11					Sem ficha clinica	
12					Sem ficha clinica	
13	9	M	24	12	Diarréia, abscesso perianal, neutropenia	
14	20	M	-	-	Pneumonia	
15	12	F	-	-	Infecções de pele	
16	12	F	24	12		<i>K.</i>

					Pneumonia, ITU, diarreia, abscesso esplênico, sepse	<i>pneumoniae</i>
17	1 dia	M	12	4	Pneumonia, celulite, artrite, sepse	Gram +
18	72	F	156	108	Infecção	<i>P. aureoginosa</i>
19					Sem ficha clinica	
20					Sem ficha clinica	
21	36	M	60	48	Otite, amigdalite, ITU, conjuntivite	<i>E.coli</i>
22		F			Sem ficha clinica	
23	2	M	48	24	Otite, pneumonia, ITU, diarreia	
24		F			Sem ficha clinica	
25	36	M	108	100	Infecções de pele, celulite de coxa	
26	-	F			Sem ficha clinica	
27	112	M	156	144	Celulite, osteomelite	
28		M			Sem ficha clinica	
29	36	F	36	32	Pneumonia	<i>P. aureoginosa</i>
30	15 dias	M	48	30	Pneumonia, infecções de pele, sepse	
31		F			Sem ficha clinica	
32	30	F	36	30	Pneumonia, amigdalite, ITU, sinusite	
33	15	M	48	46	Pneumonia, colite, deficiência GDPD	
34		M			Sem ficha clinica	
35		M			Sem ficha clinica	

36		F			Sem ficha clinica	
37		F			Sem ficha clinica	
38	8	F	36	24	Pneumonia	<i>S. aureus</i>

4.2 Testes Bioquímicos

A padronização dos testes bioquímicos foi realizada por nosso grupo de pesquisa, o que facilitou o diagnóstico de pacientes pelo teste de DHR em lugar do teste do NBT, usado originalmente na triagem da doença ³¹.

4.2.1 Avaliação da explosão respiratória pelo teste DHR (Dihidro-rodamina)

Dos 54 casos sugestivos de DGC, 18 deles apresentaram uma explosão respiratória reduzida, tanto nas populações de monócitos como de granulócitos estimuladas com PMA comparados aos controles sadios. De acordo a vasta experiência de nosso laboratório em diagnóstico de DGC, se consideram normais aqueles valores de MFI que na população de monócitos estimulados (PMA) dobram ou triplicam os valores da mesma população não estimulada (ESP). No caso dos granulócitos estimulados os valores se incrementam e se apresentam de 5 a 10 vezes maiores em comparação a população que não recebeu estímulo.

A análise do teste bioquímico foi realizada por meio de citometria de fluxo, onde se diferenciam as populações de interesse e se selecionam num *gate*, os quais foram analisados separadamente com o mesmo critério segundo os parâmetros de FSC (*Forward scatter*) e SSC (*Side scatter*) seguido de análises da media estatística dos valores (MFI) (Figura 8).

Figura 8. Esquema representativo da análise do teste de DHR nas amostras analisadas por meio de citometria de fluxo.

Os resultados das duas populações analisadas se detalham a seguir:

Na população de monócitos analisadas, com explosão respiratória “espontânea” os valores de FMI para as amostras dos controles sadios foram maiores (ESP: 62,31) em comparação com os dos pacientes DGC (ESP: 54,09).

Na população de monócitos onde a explosão respiratória foi “estimulada” com PMA, os valores de FMI dos controles sadios duplicaram em quantidade (PMA: 132,65) comparados aos valores achados nas amostras dos pacientes DGC (PMA: 83,35) (Figura 9 A).

Nas populações de granulócitos com explosão respiratória “espontânea” as amostras dos controles (ESP: 99,13) resultaram no dobro dos valores encontrados nos pacientes DGC (ESP: 67,09).

No caso dos granulócitos com explosão respiratória “estimulada” os valores de FMI foram significativamente maiores nos controles sadios (PMA: 2101,38) comparados aos valores achados nos pacientes DGC (PMA: 221,12) (Figura 9 B).

Figura 9. Resultados do DHR em pacientes com diagnóstico sugestivo de DGC e controles sadios. Amostras com estímulo (PMA) e sem estímulo (ESP). **A)** População de monócitos. **B)** População de granulócitos (Resultados expressos em MFI (*Median fluorescence Intensity*, em escala logarítmica) (N=18).

A **B**

4.3 Análise estatística

A análise estatística de *Mann-Whitney* possibilitou a confirmação das diferenças de valores achados no teste de DHR dos pacientes DGC em comparação aos controles sadios, tanto na população de monócitos ($P < 0,0015$) como na população de granulócitos ($P < 0,0001$). Os gráficos resultantes encontram-se na figura 10.

Figura 10. Análise estatística pelo teste Mann-Whitney dos valores MFI pelo teste de DHR. **A.** População de monócitos ($p < 0,0015$). **B.** População de granulócitos ($p < 0,0001$)(N=18).

4.4 Expressão de proteínas do sistema NADPH oxidase

Posteriormente ao diagnóstico bioquímico dos 18 pacientes DGC analisou-se a expressão protéica do sistema NADPH oxidase em 6 desses pacientes, uma menina e 5 meninos, conforme a disponibilidade de anticorpos e a viabilidade das amostras.

A figura 11 representa os resultados achados na análise de citometria de fluxo dos pacientes.

A primeira parte da figura (**A**) exibe o gráfico resultante para os valores de MFI na análise da proteína citoplasmática p47-phox (PE) tanto no controle sadio (preto) como na paciente 6 (cinza). Claramente, observa-se uma atenuação na expressão da proteína de interesse.

Os gráficos correspondentes a secção (**B**) da figura 11, pertencem aos resultados da marcação do complexo citocromo *b* (FITC) em 5 pacientes masculinos (2/ 11/ 12/ 13/ 14). Em todos os casos analisados, a expressão protéica do complexo de membrana citocromo *b* dos pacientes (cinza) se mostrou diminuída em comparação aos controles (preto) resultado que leva a considerar o defeito em alguma das proteínas envolvidas na formação do complexo estudado.

Os seis casos abordados foram encaminhados para análise genética dos genes codificantes relacionados aos componentes protéicos afetados. Os casos remanescentes serão estudados nas próximas etapas do estudo.

Figura 11. Avaliação das proteínas do sistema NADPH oxidase em controles saudáveis (preto) e pacientes suscetíveis do DGC (cinza). **A:** Proteínas citoplasmáticas marcadas com FITC (cit b). **B:** Proteínas de membrana marcadas com FITC (cit b).

4.5 Análise genético-molecular

Dos 54 pacientes encaminhados com diagnóstico presuntivo de DGC, 38 deles foram excluídos de nossa análise genético molecular devido aos resultados normais segundo o teste do DHR utilizado no diagnóstico.

Dos 18 pacientes com diagnóstico DGC incluídos em nossa análise molecular o DNA genômico de 18 pacientes, 7 meninas e 11 meninos, foram extraídos permitindo amplificar os exons de interesse.

4.6 Casuística

4.6.1 Mutações na DGC autossômica

Considerando que as bases genético-moleculares nos casos de deficiência de p47-phox são mais homogêneas que as observadas nas deficiências de gp91-phox ligada ao X, dos 18 pacientes diagnosticados o total das amostras de pacientes femininos foram submetidos ao sequenciamento direto. De acordo com as nossas expectativas, foram achadas mutações em 3 dos 7 casos analisados geneticamente. Os históricos clínicos das pacientes cuja mutação foi achada são descritos a seguir:

Paciente 5 (Natal - RN): 14 anos.

Primeiros sintomas: 5 meses.

Reação BCG: Não.

Antecedentes familiares: Sim, irmã com diagnóstico de DGC.

Manifestações: Abscessos de pele e furúnculos, otite, pneumonia, ITU, colite, granuloma no gânglio cervical, dermatite seborreica.

Organismo isolado: Nenhum.

Paciente 6 (Rio de Janeiro - RJ): 2 anos

Primeiros sintomas: 7 dias.

Reação BCG: Sim.

Antecedentes familiares: Sim.

Manifestações: abscesso de pele em parede torácica e pé esquerdo, 3 pneumonia, 1 ITU, 1 osteomielite, colite, sepse.

Organismo isolado: *K. pneumoniae*, CA-MRSA.

Paciente 7 (Rio de Janeiro): 12 anos.

Primeiros sintomas: 8 anos.

Reação BCG: não.

Antecedentes familiares: não.

Manifestações: 2 otite 1 pneumonia, 2 amigdalite, 1 osteomielite de quadril, 1 hiperplasia de linfonodos, 1 infecção de pele, 1 estomatite.

Organismo isolado: *A. fumigatus*.

Nos 3 casos com diagnóstico genético-molecular concluído, foi encontrada a mutação já descrita no gene *NCF1* especificamente no início do exon 2, o qual codifica a proteína p47-phox do complexo NADPH oxidase.

A mutação se apresenta como uma deleção c.75_76delGT (Δ GT) causante de um *frameshift* e a formação de um códon de parada prematuro (p.Tyr26fsX26), esta mutação simples é encontrada em 90% dos casos de DGC A47°⁵⁹.

A deleção GT no gene *NCF1* de nossas pacientes, se encontra representada na figura **12** comparada com a sequência do controle sadio.

A partir da análise detalhada, a sequência das pacientes portadoras da mutação se observa “limpa” a partir da ordem de nucleotídeos (CAGGTACATG) a deleção GT permite uma “compensação” de bases, produto da recombinação do gene com o pseudogenes já descrito. No entanto, nas amostras dos controles sadios a ordem dos nucleotídeos se altera notavelmente e a sobreposição de bases do gene *NCF1* inalterado é evidente.

Figura 12: Sequências de DNAg do gene *NCF1*. **A.** Paciente portador da deleção GT. As setas indicam o “hot spot” no início do éxon 2. **B.** Sequências do controle sadio.

Nos 4 casos restantes a mutação no éxon 2 do gene p47-phox foi descartada mediante novos sequenciamentos. A seguir serão analisados outros exons envolvidos na codificação da proteína e posteriormente outros genes em busca das mutações responsáveis pelo fenótipo das crianças comprometidas.

4.6.2 Mutações na DGC ligada ao X

Nos 11 casos de meninos incluídos na análise genética todos os exons do gene *CYBB* foram amplificados mediante PCR e purificados por meio de *kit*.

A análise das sequências resultantes mediante os *softwares* descritos possibilitaram achar a mutação no gene *CYBB* de 4 pacientes com o históricos clínicos altamente sugestivo de DGC como se descreve a continuação:

Paciente 8 (DF- Brasília): 16 anos

Primeiros sintomas: 9 meses

Reação BCG: Sim, disseminada.

Antecedentes familiares: Não.

Manifestações: impetigo bolhoso, 2 otites, 4 pneumonias, 3 ITU, 3 amigdalites.

Organismo isolado: *M. bovis*.

A mutação se apresentou como uma substituição do tipo *nonsense* c.271C>T; resultante em um códon de parada prematuro (p.Arg91X) na cadeia pesada do complexo *citocromo b₂₄₅* (gp91-phox). A figura 13 exibe a sequência de nucleotídeos do fragmento de interesse com a mutação C>T comparada a sequência normal do controle sadio.

Figura 13. Sequências de DNAG do exon 3 do gene CYBB. A. Paciente portador da substituição C>T em comparação com a sequência do paciente controle.

Paciente 11 (Curitiba - PR): 2 anos

Primeiros sintomas: 4 meses

Reação BCG: Não.

Antecedentes familiares: Não.

Manifestações: abscesso cutâneo, hiperplasia do linfonodo, 2 pneumonias, 3 amigdalites, colite recorrente.

Organismo isolado: nenhum.

A mutação desse paciente se apresentou como *nonsense* c.380G>A causando a formação de um códon de parada (TGG>TGA) no exon 9 da cadeia pesada do

complexo citocromo b_{245} (p.trp91X), em coincidência com o achado o paciente 18 (sem ficha clínica) apresentou a mesma mutação detalhada na figura 14.

Figura 14. Sequências do exon 9 do gene *CYBB*, mutação *nonsense*. **A.** Controle sadio. **B.** Pacientes.

Paciente 14 (São Paulo - SP): 15 anos

Primeiros sintomas: 5 meses

Reação BCG: Não especificada.

Antecedentes familiares: Não.

Manifestações: abscesso cutâneo, abscesso pulmonar, 10 otites, 2 pneumonias, 10 amigdalites, osteomielite.

Organismo isolado: *S. aureus*, *A.fumigatus*.

No caso, a mutação foi encontrada no exon 11 do gene *CYBB*, se apresentou como uma deleção do G presente na borda intronica (c.487 delG) resultante no códon de parada prematuro GTA (p.his91X) na cadeia pesada do citocromo b_{245} . A figura 15 representa o sitio da deleção e a formação do códon de parada.

Figura 15. Sequências de DNAg do exon 11 do gene *CYBB*, deleção de G. **A.** controle sadio. **B.** Paciente.

Nos 7 casos restantes dos pacientes masculinos DGC foram seqüenciados o 60% dos exons do gene *CYBB* e nenhuma mutação foi achada até o momento, nossa pesquisa continua na procura dos defeitos genéticos causantes dos fenótipos, tanto no gene *CYBB* como nos restantes genes possivelmente envolvidos na doença.

5 DISCUSSÃO

A DGC é caracterizada tradicionalmente como uma imunodeficiência causada pela perda ou ausência da função do sistema NADPH oxidase, resultante numa diminuída ou ausente produção de espécies reativas de oxigênio ¹²⁰. Infecções e lesões com granulomas são usualmente as primeiras manifestações em órgãos como pulmões, pele, linfonodos e fígado ²⁶.

Infecções por fungos invasivos integram a lista de patógenos com maior prevalência em DGC comparado com as outras imunodeficiências primárias, estes se desenvolvem principalmente nas primeiras duas décadas de vida e a incidência abrange entre 20 a 40 % por paciente ^{121, 122}. Coincidentemente nossos estudos refletiram infecções por *A. fumigatus* em 2 de nossos pacientes com diagnóstico DGC confirmado, os dois casos tiveram diagnóstico molecular concluído, um deles apresentou uma severa osteomielite no quadril esquerdo cujo organismo isolado foi a espécie oportunista.

As infecções por estafilococos são as mais comuns nos pacientes DGC devido a uma baixa expressão nos receptores imunológicos inatos como TLR5, TLR9, CD11b, CD18 e CXCR1G¹²³. A redução de TLR5 provoca um desequilíbrio na ativação de neutrófilos na presença de bactéria flageladas assim como a redução de CD11b/CD18 foi estreitamente relacionado ao defeito na fagocitose de *S. aureus* ¹²⁴. Concordando com esses achados, 4 de nossos pacientes apresentaram infecção com *S. aureus*, os quais manifestaram abscessos de pele, dois deles a sua vez, coincidem com o isolamento da cepa virulenta CA-MRSA reconhecida pela resistência a antibióticos beta-lactâmicos como a penicilina e meticilina. O diagnóstico molecular de nossos pacientes demonstrou que 6 dos 7 apresentaram abscessos de pele e pneumonias recorrentes embora *S.aureus* tenha sido isolado somente num dos casos.

Alguns estudos observaram a infecção em pacientes DGC pelo *K. pneumoniae*, embora a prevalência seja menor que outras bactérias gram negativas, um de nossos pacientes com diagnóstico molecular manifestou pneumonia de maneira recidivantes causada pelo organismo ^{125, 126}.

A formação de granulomas e a inflamação desregulada no trato gastrointestinal afeta comumente os pacientes DGC. Essas manifestações incluem edema pilórico, granulomas esofágicos, de jejuno, ileon e reto similares aos descritos para a doença de *Crohn*. O sintoma mais indicativo da colite na DGC inclui colite, dores abdominais e a formação de fistulas segundo estudos específicos realizados por Marciano et al. (2004). Dos pacientes estudados por nosso grupo, 4 deles manifestaram colite e sintomas coincidentes com a literatura consultada, 3 deles tiveram diagnóstico molecular da doença.

Claramente alguns trabalhos demonstram que em casos de osteomielite os pacientes apresentam infecções por *Aspergillus sp* e *Serratia sp*, as localizações mais frequentemente encontradas são costelas, vértebras, fêmur, estagálo e tíbia¹²⁷ afetando o crescimento dos pacientes no 75 % dos casos¹²⁸, 3 de nossos casos apresentaram osteomielite onde os organismos isolados foram *A. fumigatus* e *S. aureus* e a cepa CA-MRSA. O diagnóstico genético foi concluído nos 3 casos, e num deles observou-se destruição de vértebras provavelmente por causa da cepa CA-MRSA.

A vacina BCG é administrada em diversos países com raras reações adversas. *Mycobacterium bovis* ou o Bacilo Calmette-Guerin é um agente oportunista responsável pela disseminação da doença em indivíduos imunocomprometidos cujos macrófagos falham na erradicação da BGC, como acontece em dois dos sete casos diagnosticados geneticamente como portadores da DGC detalhados neste trabalho.

Estudos genético moleculares dos pacientes DGC levam a descrição de múltiplas e diversas mutações, a forma mais comum da doença é causada por mutações no gene *CYBB* (Xp21.1) que codifica a proteína gp91-phox, também conhecida como NOX2, dita proteína e uma das duas subunidades do flavocitocromo *b₅₅₈*, sendo a outra conhecida como p22-phox, trabalhos recentes realizados por Roos et al no 2010 adicionaram 338 novas mutações identificadas a um total de 681 diferentes em 1267 casos não relacionados, incluindo na maior parte delas deleções (35,6 %) mutações do tipo *missense* (21,3 %), no sítio de *splicing* (17,6 %) e mutações *nonsense* (14,1 %) sendo as restantes inserções e mutações nas sequências promotoras. Dentro do tipo de mutações do tipo

nonsense se encontra a mutação já descrita encontrada em nosso paciente no exon 3 do gene *CYBB*, provocada por uma troca de nucleotídeo (c.271C>T) que leva a um códon de parada prematuro (p.Arg91X).

Em quanto as mutações que afetam a dois de nosso pacientes, no exon 9 do gene *CYBB* (c.380G>A) levam a formação de um códon de parada prematuro (p.trp91X), também se encontra descrita na literatura.

Por outra parte, a mutação que afeta o exon 11 do gene *CYBB* de um de nossos pacientes, a deleção do G (c.487delG) precisa ser esclarecida devido a presença de uma borda intronica nesse sitio, a deleção presente na região pode derivar numa deleção completa do exon ou num códon de parada prematuro (p.his91X).

Nas mutações do tipo autossômicas, o efeito genético predominante em pacientes DGC é a deleção GT no começo do exon 2. A presença de dois pseudogenes *NCF1B* e *NCF1C* dificulta a identificação da mutação devido a homologia de 98% com o gene funcional *NCF1*. Os eventos recombinantes entre *NCF1* e os pseudogenes flanqueantes como a deleção c75_76delGT resultou na incorporação da deleção dentro do alelo *NCF1* segundo o trabalho publicado por Gorlach et al (1997). A mutação descrita foi encontrada em 3 de nossas pacientes, a expressão protéica da p47-phox foi ausente num dos casos analisados em coincidência com a literatura ¹²⁹.

Por enquanto, as formas de DGC que compreendem mutações no gene *CYBA* da cadeia leve do citocromo *b₅₅₈* onde foram documentadas até o 2010, 55 diferentes mutações em 96 indivíduos ^{71, 129} e aquelas descritas nos genes *NCF2* e *NCF4* cujos transcritos compreendem diversas isoformas resultantes no processo de *splicing* alternativo não foram documentadas no presente trabalho.

6 CONCLUSOES

- a) A análise das 16 fichas clínicas disponíveis refletiu que a metade do grupo de estudo possui uma idade de entre 1-3 anos e a outra parte se encontra numa faixa etária entre os 7-22 anos, sendo que 50% deles foi diagnosticado entre antes dos 3 anos, 38 % entre 7-22 anos e em 12% deles o diagnóstico foi realizado entre 3-6 anos.
- b) Os patógenos isolados em 7 pacientes foram representados pelas espécies de *S. aureus* (57 %), *A. fumigatus* (28%), bactérias gram positivas (14 %) e a cepa CA-MRSA (2 %).
- c) O análises da explosão respiratória dos pacientes DGC em comparação ao pacientes controles foi altamente significativa, tanto na população de monócitos (132,65 vs 83,35) como de granulócitos estimulados com PMA (2101,38 vs 221,12)
- d) A expressão protéica dos 6 pacientes analisados se apresentou consideravelmente reduzida tanto no análise da proteína p47-phox como do complexo citocromo *b₅₅₈*.
- e) A análise genético-molecular permitiu achar a mutação característica do exon 2 no gene *NCF1* em 3 pacientes do sexo feminino e 3 mutações diferentes no gene *CYBB* em 4 pacientes masculinos.

REFERENCIAS¹

1. Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med.* 1957;40(5):309-12.
2. 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(4):387-408.
3. Landing BH, Shirkey HS. A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes. *Pediatrics.* 1957;20(3):431-8.
4. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI., et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore).* 2000;79(3):155-69.
5. Wolach B, Gavrieli R, de Boer M, Gottesman G, Ben-Ari J, Rottem M, et al. Chronic granulomatous disease in Israel: clinical, functional and molecular studies of 38 patients. *Clin Immunol.* 2008;129(1):103-14.
6. Fattahi F, Badalzadeh M, Sedighipour L, Movahedi M., Fazlollahi MR., Mansouri SD, et al. Inheritance pattern and clinical aspects of 93 Iranian patients with chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol.* 2011;31(5):792-801.
7. Martire B, Rondelli R, Soresina A, Pignata C, Broccoletti T, Finocchi A, 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(2):155-64.
8. Parkos CA, Dinanier MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis A J, 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(10):3319-23.
9. Clark RA, Malech L, Gallin JI, Nunoi H, Volpp BD, Pearson DW, et al. Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med.* 1989;321(10):647-52.

---

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

10. Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis.* 1999;179 Suppl 2:S309-17.
11. Dinanuer 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(5):1729-37.
12. Stasia MJ, Li XJ. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol.* 2008;30(3):209-35.
13. Johnston RB, Jr. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol.* 2001;8(1):17-22.
14. Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li X J. 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(15):3309-15.
15. de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol.* 2011;73(5):420-7.
16. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(5):578-84.
17. Curnutte JT. Classification of chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1988;2(2):241-52.
18. 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(14):10813-9.
19. Rae J, Newburger PE, Dinanuer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, et al. 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(6):1320-1331.
20. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore).* 2000;79(3):170-200.

21. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(1):42-7.
22. de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol*. 73(5):420-7.
23. Lew PD, Southwick F, 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(22):1329-33.
24. Newburger PE, Luscinskas FW, Ryan T, Beard CJ, Wright J, Platt OS, et al. Variant chronic granulomatous disease: modulation of the neutrophil defect by severe infection. *Blood*. 1986;68(4):914-19.
25. Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1996;87(5):1663-81.
26. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010;38(1):3-10.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973;52(3):741-4.
31. Patino PJ, Perez JE, Lopez JA, Condino-Neto A, Grumach AS, Botero JH, et al. Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-phox. *Hum Mutat*. 1999;13(1):29-37.

32. Agudelo-Florez P, Navarro S, Luttges P, Lopez JA, Norambuena X, Navarrete SCI, et al. [Report of a new mutation in CYBB gene in two patients with X linked chronic granulomatous disease]. *Rev Med Chil.* 2006;134(8):965-72.
33. Agudelo-Florez P, Prando-Andrade CC, Lopez JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FJ, et al. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46(2):243-52.
34. Oliveira-Júnior EB, Prando J, Alvaro Lopez JC, Arango M, Buzolin J, Rehder et al. 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.* 2010.
35. Baehner RL, Kunkel LM, Monaco AP, Haines JL, Conneally PM, Palmer C, et al. DNA linkage analysis of X chromosome-linked chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(10):3398-401.
36. Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J, Noack D, Roos D, van Koppen E, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27(1):16-26.
37. Barese CN, Copelli SB, De Matteo E, Zandomeni R, Salgueiro F, Di Giovanni D, et al. Molecular characterization of a novel splice site mutation within the CYBB gene leading to X-linked chronic granulomatous disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2005;44(4):420-2.
38. Jurkowska M, Bernatowska E, Bal J. Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2004;52(2):113-20.
39. 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(2):372-80.
40. Di Matteo G, Giordani L, Finocchi A, Ventura A, Chiriaco M, Blancato J, 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(10):1935-41.
41. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis.* 2010.

42. Lyon MF. Order of loci on the X-chromosome of the mouse. *Genet Res.* 1966;7(1):130-3.
43. Lyon MF. The Lyon and the LINE hypothesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14(6):313-18.
44. Battersby AC, Cale CM, Goldblatt D, Gennery AR. Clinical Manifestations of Disease in X-Linked Carriers of Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol.* 2013.
45. Vowells SJ, Fleisher TA, Malech HL. Testing for chronic granulomatous disease. *Lancet.* 1996;347(9007):1048-49.
46. Thompson EN, Soothill JF. Chronic granulomatous disease: quantitative clinicopathological relationships. *Arch Dis Child.* 1970;45(239):24-32.
47. Lovas JG, Issekutz A, Walsh N, Miller RA. Lupus erythematosus-like oral mucosal and skin lesions in a carrier of chronic granulomatous disease. Chronic granulomatous disease carrier genodermatosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80(1):78-82.
48. Foti C, Cassano N, Martire B, Filotico R, Mastrandrea V, Vena GA. Lupus erythematosus-like lesions in a carrier of X-linked chronic granulomatous disease: a case report and personal considerations. *Int J Dermatol.* 2004;43(11):840-42.
49. Cale CM, Morton L, Goldblatt D. Cutaneous and other lupus-like symptoms in carriers of X-linked chronic granulomatous disease: incidence and autoimmune serology. *Clin Exp Immunol.* 2007;148(1):79-84.
50. Sillevs Smitt JH, Weening RS, Krieg SR, Bos JD. Discoid lupus erythematosus-like lesions in carriers of X-linked chronic granulomatous disease. *Br J Dermatol.* 1990b;122(5):643-50.
51. Martin-Villa JM, Corell A, Ramos-Amador JT, Ruiz-Contreras J, Arnaiz-Villena A. Higher incidence of autoantibodies in X-linked chronic granulomatous disease carriers: random X-chromosome inactivation may be related to autoimmunity. *Autoimmunity.* 1999;31(4):261-64.
52. Cordoba-Guijarro S, Feal C, Dauden E, Fraga J, Garcia-Diez A. Lupus erythematosus-like lesions in a carrier of X-linked chronic granulomatous disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;14(5):409-11.
53. 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(5):425-8.

54. de Boer M, de Klein A, Hossle JP, Seger R, Corbeel L, Weening RS, et al. 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(5):1127-35.
55. Dinanuer MC, Lekstrom-Himes JA, Dale DC. Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2000:303-18.
56. 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(7):2753-7.
57. Volpp BD, 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(1):201-7.
58. Iwata M, Nunoi H, Yamazaki H, Nakano T, Niwa H, Tsuruta S, et al. Homologous dinucleotide (GT or TG) deletion in Japanese patients with chronic granulomatous disease with p47-phox deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199(3):1372-7.
59. Vazquez N, Lehrnbecher T, Chen R, Christensen BL, Gallin JI, Malech H, et al. 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(2):234-43.
60. Gorlach A, Lee PL, Roesler J, Hopkins PJ, Christensen B, Green ED, et al. A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox- deficient chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 1997;100(8):1907-18.
61. Noack D, Rae J, Cross AR, Ellis BA, Newburger PE, Curnutte JT, et al. 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(1):305-11.
62. 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(5):1845-51.
63. Dekker J, de Boer M, Roos D. Gene-scan method for the recognition of carriers and patients with p47(phox)-deficient autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Exp Hematol.* 2001;29(11):1319-25.

64. Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, Good RA. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet*. 1966;1(7449):1225-8.
65. 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(9):1422-32.
66. Segal BH, Holland SM. Primary phagocytic disorders of childhood. *Pediatr Clin North Am*. 2000;47(6):1311-38.
67. Wientjes FB, Segal AW, Hartwig JH. Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *J Leukoc Biol*. 1997;61(3):303-12.
68. Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1307-15.
69. Odell EW, Segal AW. Killing of pathogens associated with chronic granulomatous disease by the non-oxidative microbicidal mechanisms of human neutrophils. *J Med Microbiol*. 1991;34(3):129-135.
70. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*. 2002;416(6878):291-97.
71. Leiding JW, Holland SM. *Chronic Granulomatous Disease*. 2012.
72. Rosenzweig SD. Inflammatory manifestations in chronic granulomatous disease (CGD). *J Clin Immunol*. 2008;28 Suppl 1:S67-72.
73. Friend JC, Hilligoss DM, Marquesen M, Ulrick J, Estwick T, Turner ML, et al. Skin ulcers and disseminated abscesses are characteristic of *Serratia marcescens* infection in older patients with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):164-6.
74. Casanova JL, Blanche S, Emile JF, Jouanguy E, Lamhamedi S, Altare F, et al. Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guerin infection: a French national retrospective study. *Pediatrics*. 1996;98(4 Pt 1):774-8.
75. Lamhamedi-Cherradi S, de Chastellier C, Casanova JL. Growth of *Mycobacterium bovis*, Bacille Calmette-Guerin, within human monocytes-macrophages cultured in serum-free medium. *J Immunol Methods*. 1999;225(1-2):75-86.

76. Sirinavin S, Techasaensiri C, Benjaponpitak S, Pornkul R, Vorachit M. Invasive *Chromobacterium violaceum* infection in children: case report and review. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(6):559-61.
77. Mailman TL, Schmidt MH. *Francisella philomiragia* adenitis and pulmonary nodules in a child with chronic granulomatous disease. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(4):245-8.
78. Greenberg DE, Ding L, Zelazny AM, Stock F, Wong A, Anderson VL, et al. A novel bacterium associated with lymphadenitis in a patient with chronic granulomatous disease. *PLoS Pathog*. 2006;2(4):e28.
79. Lopez FC, de Luna FF, Delgado MC, de la Rosa, II, Valdezate S, Nieto JA, et al. *Granulibacter bethesdensis* isolated in a child patient with chronic granulomatous disease. *J Infect*. 2008;57(3):275-7.
80. Kottlilil S, Malech HL, Gill VJ, Holland SM. Infections with *Haemophilus* species in chronic granulomatous disease: insights into the interaction of bacterial catalase and H₂O₂ production. *Clin Immunol*. 2003;106(3):226-30.
81. Nagatomo T, Ohga S, Saito M, Takada H, Sasaki Y, Okada K, et al. *Streptococcus intermedius*-brain abscess in chronic granulomatous disease. *Eur J Pediatr*. 1999;158(10):872-3.
82. Falcone EL, Holland SM. Streptococcal infections in patients with chronic granulomatous disease: case report and review of the literature. *J Clin Immunol*. 2012;33(2):310.
83. Segal AW, Harper AM, Garcia RC, Merzbach D. The action of cells from patients with chronic granulomatous disease on *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 1982;15(4):441-9.
84. Tauber AI, Borregaard N, Simons E, Wright J. Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine (Baltimore)*. 1983;62(5):286-309.
85. Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Johnston RB. Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1988;2(2):253-66.
86. Movahedi M, Aghamohammadi A, Rezaei N, Farhoudi A, Pourpak Z, Moin M, et al. Gastrointestinal manifestations of patients with chronic granulomatous disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2004;3(2):83-7.

87. Dotis J, Roilides E. Osteomyelitis due to *Aspergillus* species in chronic granulomatous disease: an update of the literature. *Mycoses*. 2010;54(6):e686-96.
88. Henriet SS, Verweij PE, Warris A. *Aspergillus nidulans* and chronic granulomatous disease: a unique host-pathogen interaction. *J Infect Dis*. 2012;206(7):1128-37.
89. 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.
90. 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 Suppl*. 1968;97:77-89.
91. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-55.
92. McCord JM, 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*. 1969;244(22):6056-63.
93. 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(5):485-90.
94. Condino-neto A, Muscara MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandao AC, Grumach AS, et al. Effect of therapy with recombinant human interferon-gamma on the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. *J Interferon Cytokine Res*. 1996;16(5):357-64.
95. Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*. 1988; 75(7):354-5.
96. Kim HY, Kim HJ, Ki CS, Kim DW, Yoo KH, Kang ES. Rapid determination of chimerism status using dihydrorhodamine assay in a patient with X-linked chronic granulomatous disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Lab Med*. 2013;33(4):288-92.
97. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, et al. Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2013;33(4):857-64.

98. Margolis DM, Melnick DA, Alling D, Gallin JI. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *J Infect Dis.* 1990;162(3):723-6.
99. Gallin JI, Alling DW, Malech HL, Wesley R, Koziol D, Marciano B, et al. Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 2003;348(24):2416-22.
100. Segal BH, Barnhart LA, Anderson VL, Walsh TJ, Malech HL, Holland SM. Posaconazole as salvage therapy in patients with chronic granulomatous disease and invasive filamentous fungal infection. *Clin Infect Dis.* 2005;40(11):1684-8.
101. Errante PR, Frazao JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2008;3(3):225-30.
102. 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.
103. Roifman CM, Fischer A, Notarangelo LD, de la Morena MT, Seger RA. Indications for hemopoietic stem cell transplantation. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010;30(2):261-2.
104. Satwani P, Cooper N, Rao K, Veys P, Amrolia P. Reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation in childhood malignant and nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41(2):173-82.
105. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, Ringden O, Syrukov Z, Bekassy A, et al. Busulfan bioavailability. *Blood.* 1994;84(7):2144-50.
106. Remberger M, Sundberg B. Cytokine production during myeloablative and reduced intensity therapy before allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2004;89(6):710-6.
107. Ahlin A, Fugelang J, de Boer M, Ringden O, Fasth A, Winiarski J. Chronic granulomatous disease - haematopoietic stem cell transplantation versus conventional treatment. *Acta Paediatr.* 2013;102(11):1087-94.
108. Seger RA, Gungor T, Belohradsky BH, Blanche S, Bordigoni P, Di Bartolomeo P, 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(13):4344-50.

109. Soncini E, Slatter MA, Jones LB, Hughes S, Hodges S, Flood TJ, 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(1):73-83.
110. Schuetz C, Hoenig M, Gatz S, Speth F, Benninghoff U, Schulz A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation from matched unrelated donors in chronic granulomatous disease. *Immunol Res.* 2009;44(1-3):35-41.
111. Tewari P, Martin PL, Mendizabal A, Parikh SH, Page KM, Driscoll TA, et al. Myeloablative transplantation using either cord blood or bone marrow leads to immune recovery, high long-term donor chimerism and excellent survival in chronic granulomatous disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(9):1368-77.
112. Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ, et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(22):12133-8.
113. Dinuer MC, Gifford MA, Pech N, Li LL, Emshwiller P. Variable correction of host defense following gene transfer and bone marrow transplantation in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood.* 2001;97(12):3738-45.
114. Kang EM, Hsieh MM, Metzger M, Krouse A, Donahue RE, Sadelain M, et al. Busulfan pharmacokinetics, toxicity, and low-dose conditioning for autologous transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells in the rhesus macaque model. *Exp Hematol.* 2006;34(2):132-9.
115. Suerth JD, Maetzig T, Brugman MH, Heinz N, Appelt JU, Kaufmann KB, et al. Alpharetroviral self-inactivating vectors: long-term transgene expression in murine hematopoietic cells and low genotoxicity. *Mol Ther.* 2012;20(5):1022-32.
116. Grez M, Becker S, Saulnier S, Knoss H, Ott MG., Maurer A., et al. Gene therapy of chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25 Suppl 2:S99-104.
117. Kaufmann KB, Brendel C, Suerth JD, Mueller-Kuller U, Chen-Wichmann L, Schwable J, et al. Alpharetroviral vector-mediated gene therapy for X-CGD: functional correction and lack of aberrant splicing. *Mol Ther.* 2013;21(3):648-61.
118. Kaufmann KB, Buning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med.* 2013;5(11):1642-61.

119. Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science*. 1988;242(4883):1295-7.
120. Jakobsen MA, Katzenstein TL, Valerius NH, Roos D, Fisker N, Mogensen TH., et al. Genetical analysis of all Danish patients diagnosed with chronic granulomatous disease. *Scand J Immunol*. 2012;76(5):505-11.
121. Beaute J, Obenga G, Le Mignot L, Mahlaoui N, Bougnoux ME, Mouy R, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal diseases in patients with chronic granulomatous disease: a multicenter study in France. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1):57-62.
122. Blumental S, Mouy R, Mahlaoui N, Bougnoux ME, Debre M, Beaute J, et al. Invasive mold infections in chronic granulomatous disease: a 25-year retrospective survey. *Clin Infect Dis*. 2011;53(12):e159-69.
123. Hartl D, Lehmann N, Hoffmann F, Jansson A, Hector A, Notheis G, et al. Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2):375-79.
124. Rieber N, Hector A, Kuijpers T, Roos D, Hartl D. Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:252460.
125. Soler-Palacin P, Margareto C, Llobet P, Asensio O, Hernandez M, Caragol I, et al. Chronic granulomatous disease in pediatric patients: 25 years of experience. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007;35(3):83-9.
126. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y., Suzuki K., et al. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57(5):S15.
127. van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One*. 2009;4(4):e5234.
128. Jones LB, McGrogan P, Flood TJ, Gennery AR, Morton L, Thrasher A, et al. Special article: chronic granulomatous disease in the United Kingdom and Ireland: a comprehensive national patient-based registry. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(2):211-18.

129. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Bustamante J, Kannengiesser C, de Boer M, et al. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44(4):291-9.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de consentimento livre esclarecido.**Universidade de São Paulo****Instituto de Ciências Biomédicas**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**(menores de 18 anos)****ESTUDO: ESPECTRO CLÍNICO E DEFEITOS GENÉTICO-MOLECULARES DE
PACIENTES COM DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA**

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(a) seu (sua) filho(a).

Eu ..... , RG ..... , abaixo assinado (a),
concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a)
..... nascido (a) em ____ / ____ / ____ , seja voluntário do estudo
“**ESPECTRO CLÍNICO E DEFEITOS GENÉTICO-MOLECULARES DE PACIENTES COM
DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA**”. Declaro que obtive todas as informações necessárias
e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

- I) O estudo é necessário para que se possam descobrir as possíveis causas e/ou o tratamento (adequar o texto) da doença denominada “**Doença Granulomatosa Crônica**” (explicar o que significam os termos científicos)

- II) Serão feita a coleta de 10 ml de sangue periférica por punção venosa cada ano do (a) meu (minha) filho (a);
- III) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido;
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;
- VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;
- VIII) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP - no Fone 3091.7733 (e-mail: *cep@ich.usp.br*) ou (nome e telefones de contato e e-mail do pesquisador responsável) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu (minha) filho (a).
- ( ) Sim ou ( ) Não
- X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) Resolução 196/96 – Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- OBS: Assinalar abaixo com (x):
- ( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- ( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo,   de   de 200..

( ) Paciente / ( ) Responsável .....

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: Lic. Nuria Bengala Zurro (Licenciada em Genética)

(NOME, ESPECIALIZAÇÃO)

ANEXO B - Ficha clínica.

Estudo de Pacientes com Suspeita de Imunodeficiência Primária

Laboratório de Imunologia Humana

Paciente encaminhado por:					
Nome	H.C.	Data de Nascimento _____	Sexo M F	Idade - Diagnóstico Anos____ Meses ____	
	Tel:				
Idade de Início dos primeiros sintomas: _____					
Consanguinidade Sim ( ) Não (0) Tipo_____		Nº. Gesta: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 NE*	No. filhos: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 NE*	Sadios: Sim( )Não ( ) Infec.repet. Sim ( ) Não ( )	
Antecedentes Familiares				Heredograma	
Falecimentos precoces Sim ( ) Não ( )	Parentesco _____	Idade de óbito _____	Dx IDP Sim ( ) Não ( ) DGC Sim( )Não ( ) Outra _____		
Vacinas	BCG Sim ( ) Não ( ) Não especificado ( )	Idade de aplicação _____meses	Reação adversa Sim( ) Não ( )	Adenomegalias BCG disseminada Outra _____	
Hep B – S ( )N ( )NE*	DPT/dT– S( )N ( )NE*	Tríplice – S( )N ( )NE*	Hib – S ( )N ( )NE*	Varicela – S ( )N ( )NE*	VTV – S( )N( )NE*
Sabin – S ( )N ( )NE*	Salk – S ( )N ( )NE*	Sarampo – S ( )N ( )NE*	Mening – S ( )N ( )NE*	Pneumo S( )N( )NE*	Pólio – S( )N( )NE*
Reação adversa? ( )sim ( )não.			Especificar: vacina _____ Manifestação _____		
DNPM	BDNPM S( )N( )NE*		RDNPM S( )N( )NE*. Detalhar:		

DPE	>p90% S( )N( )	<p10% S( )N(0)	>p10% e <p90% S( )N(0)	
1ª manifestação			Motivo de Estudo	
Idade _____ano _____meses	Local		Infec. Repetição Sim ( )Não ( ) Manifest. Grave Sim ( )Não ( ) História Familiar Sim ( )Não ( ) Outro Sim ( )Não (0). Especificar: _____	
Manifestações	No. de episódios	Microorg. isolado Sim ( )Não ( ) Colocar Nome do Microorganismo	Idade em cada episódio de manifestação: Especificar data em cada uma das manifestações caso ocorra mais de um episódio da mesma infecção também especificar data.	Localização
1 Otite				
2 Pneumonia				
3 Pneumonia / DP				
3 Amigdalite				
4Linfonodo (HIPERPLASIA)				
5 ITU				
6 Meningite				
7 Artrite				
8 Osteomielite				
9 Diarréia				
10 Infecções de Pele Especificar:				
11 Artrite				
12 Seps				
13 Colangite esclerosante				
14. Neutropenia				

15. HIPERPLASIA					
16. Autoimunidade					
15 Outras					
Granulomas Sim ( ) Não (0)	Nº episódios	Localização 1 TGI 2 Urinário	3 Cardíaco Outra: _____	Microorg. Isolado	No. Hospitalizações
Exames Laboratoriais – início investigação					
HMG	Hb	Leuco	NT	LT	PLQ
Linfócitos/mm³ Colocar em valores absolutos Data da dosagem: Na data da dosagem o paciente estava com alguma infecção? Qual?	CD3	CD4	CD8	CD19	CD16/56
Dosagem de	IgG	IgM	IgA	IgE	

Imunoglobulinas (Coocar os valores antes da primeira reposição de Gama) DATA da dosagem:				
Complemento	C3	C4	CH50	
Quimiotaxia		Mono	PMN	
Mono	Mig.Espontânea			
PMN	Mig estim. soro nl			
	Mig. estim. soro pcte			
Superóxido	Mono	PMN	NBT	
Esponâneo			Repouso	Estimulado
Estimulado				
Tratamento	Administração	Tratamento atual	Óbito	Causa
1 IFN γ	Sim ( )Não (0)	Sim ( )Não (0)	Sim ( )Não (0)	1 Conhecida
2 ITRA	Data de inicio		Idade _____	2 Desconhecida
3 FLUCO	_____		Autópsia	Laudos
4 SMX +TMP			Sim ( )Não ( )	
5 Prednisona				
6 TMO 7				
7. Gama (data de início)				

* = não especificado

OUTRAS MANIFESTACOES – LIVRE RELATO DE OCORRENCIAS

.....