NURIA BENGALA ZURRO

Caracterização Clínica e Genética de Pacientes Brasileiros com
Doença Granulomatosa Crônica e Susceptibilidade Mendeliana a
Infecções por Micobactérias.

Trabalho apresentado para Tese de
doutorado do Programa de Pós-Graduação
em Ciências do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo

2018

NURIA BENGALA ZURRO

**Caracterização Clínica e Genética de pacientes Brasileiros com
Doença Granulomatosa Crônica e Susceptibilidade Mendeliana a
Infecções por Micobactérias.**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Versão original

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nuria Bengala Zurro

Titulo da Tese: ***Caracterização Clínica e Genética de pacientes Brasileiros com Doença Granulomatosa Crônica e Susceptibilidade Mendeliana a Infecções por Micobactérias.***

Orientador: Antonio Condino Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ____/____/____, considerou a candidata:

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A mi sobrino, Bruno Beirut

AGRADECIMENTOS

A Universidade de São Paulo, pela educação pública e gratuita.

Ao professor Dr. Antonio Condino Neto, pela confiança absoluta desde o primeiro momento.

Aos médicos dos centros de saúde públicos, pela importante colaboração durante tantos anos de trabalho.

Aos lutadores pacientes, sem eles a nossa pesquisa seria impossível.

Ao Dr. João Bosco de Oliveira Filho, pela compreensão e liderança.

A minha mãe, por ter me ensinado acerca do amor e do valor das lutas.

Ao meu pai, pelos abraços que me reconfortarão eternamente.

A meus irmãos Sindy, Kenia e Nehuén pela alegria de viver.

A minha família Monica, Cacho, tios e primos pelo apoio constante.

A minhas amigas Paola Ojeda e Analia Gomez, pelo carinho que fortalece nosso vínculo ao longo dos anos.

A Lucas, porque seu amor acalma e cura.

A minha turma de amigos argentinos, aqueles que me acompanharam sempre: Max, Mabel, Jorge, Florencia, Carolina, Valeria, Emanuel, Vanesa, Carola e Carla.

A querida técnica chefe Cristina Arslani, sem ela este trabalho não seria possível.

A secretaria Silvana Lucchini pela boa predisposição sempre.

A minha família Uspiana em SP. Obrigada pelo aprendizado conjunto, pelos encontros e desencontros: Tábata, Marina, Lucila, Jusley, Renata, Cristiane, Edson, Paulo, Angela, Otavio, Patricia, Edgar, Paola, Lena, Josias, Stefanie e Taj.

A meus amigos porque sempre foram amigos, Marília, José e Walmir.

A todos obrigada por formar parte desta bela etapa acadêmica no país tropical.

RESUMO

Zurro NB. Caracterização Clínica e Genética de Pacientes Brasileiros com Doença Granulomatosa Crônica e Susceptibilidade Mendeliana a Infecções por Micobactérias [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Dentre pacientes com imunodeficiências primárias, existem aqueles com defeitos de fagócitos e outros componentes da imunidade inata. A doença granulomatosa crônica (DGC) é uma imunodeficiência primária (IDP) causada por mutações em um dos componentes protéicos, gp91^{-phox}, p22^{-phox}, p47^{-phox}, p67^{-phox} e p40^{-phox}, da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) dos fagócitos. Pacientes com DGC apresentam maior susceptibilidade a infecções, assim como hiperinflamação e reação adversa à vacinas como à do Bacilo Calmette-Guérin (BCG), como consequência da atividade microbida defeituosa dos fagócitos. Por outro lado, a susceptibilidade mendeliana a micobactérias (MSMD) é uma condição que predispõe os pacientes a infecções pelo gênero *Mycobacterium sp.*, levando a infecções graves e por vezes à morte. O objetivo deste trabalho foi realizar o diagnóstico clínico e a análise genético-molecular de pacientes brasileiros com DGC e MSMD. A explosão respiratória de granulócitos foi avaliada pelo ensaio de dihidrorodamina (DHR). A dosagem de citocinas do eixo IL-12/IFN- γ foi realizada mediante o ensaio de ELISA após estímulo com lisado de micobactérias (LM), proteína purificada (PPD) e BCG. O DNA genômico dos pacientes foi extraído, amplificado e sequenciado pelo método de Sanger e sequenciamento completo de exoma. Durante o período de 2014-2018, 181 pacientes com histórico clínico sugestivo de DGC e 75 pacientes com diagnóstico sugestivo de MSMD foram encaminhados ao nosso laboratório. Após avaliação clínica e bioquímica dos pacientes, 23 deles foram diagnosticadas com DGC e 16 com MSMD. A análise genético-molecular permitiu identificar mutações em 14 pacientes com DGC, nove deles com DGC ligada ao cromossomo X (DGC-X) e 5 com DGC autossômica recessiva (DGC-AR). Identificamos mutações em 5 pacientes com MSMD, sendo três delas no receptor de IL-12 e duas no receptor da IL-17.

Palavras-chave: Doença Granulomatosa Crônica. Sistema NADPH oxidase. Fagócitos. Susceptibilidade Mendeliana à infecções por micobactérias. Eixo IL-12/IFN- γ .

ABSTRACT

Zurro NB. Clinical and Genetic Characterization of Brazilian Patients with Chronic Granulomatous Disease and Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease. [PhD thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Among patients with primary immunodeficiencies, there are those with defects in phagocytes and other components of the innate immunity. Chronic granulomatous disease (CGD) is a primary immunodeficiency (PID) caused by mutations in one of the protein components, gp91^{-phox}, p22^{-phox}, p47^{-phox}, p67^{-phox} and p40^{-phox} of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oxidase of phagocytes. Patients with CDG are susceptible to infections, as well as hyperinflammation and adverse reactions to vaccines such as Bacilo Calmette-Guérin (BCG) as a consequence of defective phagocyte's microbicidal activity. On the other hand, Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) is a condition that predisposes patients to infections by the genus *Mycobacterium sp.*, leading to serious infections and sometimes death. The main goal of this study was to perform the clinical diagnosis and genetic-molecular analysis of Brazilian patients with CDG and MSMD. The respiratory burst of granulocytes was evaluated by the dihydrorhodamine (DHR) assay. Cytokine dosing of IL-12 / IFN- γ axis was performed by the ELISA assay after stimulation with mycobacterium lysate (LM), purified protein (PPD) and BCG. Patients' genomic DNA was extracted, amplified and sequenced by the Sanger method and whole exome sequencing. During the period of 2014 to 2018, 181 patients with a clinical history suggestive of CDG and 75 patients with a diagnosis suggestive of MSMD were referred to our laboratory. After clinical and biochemical evaluation, 23 of them were diagnosed with CDG and 16 with MSMD. Genetic-molecular analysis allowed the identification of mutations in 14 patients with CDG, of those 9 had X-linked DGC (X-CGD) and 5 had autosomal recessive CGD (AR-CGD). Mutations were identified in 5 MSMD patients, three in the IL-12 receptor and two in the IL-17 receptor.

Key words: Chronic Granulomatous Disease. NADPH oxidase system. Phagocytes. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. IL-12/IFN- γ axis.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	bacilo Calmette-Guérin
CYBA	subunidade α do complexo citocromo b_{558}
CYBB	subunidade β do complexo citocromo b_{558}
DGC	doença granulomatosa crônica
DHR	dihidrorodamina
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EROS	espécies reativas de oxigênio
FSC	forward scatter
GP91 ^{-phox}	phagocytic oxidase 91kd
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation
IFN- γ R1	subunidade 1 do receptor do interferon gama
IFN- γ	interferon gama
IL-12	interleucina 12
IL12RB1	receptor β 1 da IL-12
IRF8	interferon regulatory factor 8
MFI	median fluorescence intensity
MSMD	mendelian susceptibility to micobacterial disease
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCF1	neutrophil cytosol fator 1
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
P22 ^{-phox}	phagocytic oxidase 22kd
P40 ^{-phox}	phagocytic oxidase 40kd
P47 ^{-phox}	phagocytic oxidase 47kd
P67 ^{-phox}	phagocytic oxidase 67kd
PMA	phorbol miristato acetato
RAC2	rho family of GTPases
SSC	side scatter
STAT1/4	signal transducer and activator of transcription 1/4

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Manifestações clínicas sugestivas de imunodeficiência primária..	49
Figura 2. Representação da via IL-12/IFN- γ em monócitos e linfócitos.....	51
Figura 3. Representação gráfica da ativação do sistema NADPH.....	55
Figura 4. Esquema representativo do histograma observado no ensaio de DHR nos diferentes tipos de DGC..	62
Figura 5. Manifestações clínicas dos pacientes com DGC.	62
Figura 6. Índice de estimulação no ensaio de DHR.	62
Figura 7. Avaliação do eixo IL-12/IFN- γ de pacientes com DGC.	62
Figura 8. Avaliação da IL-12p40 de pacientes com DGC (PBMC).....	62
Figura 9. Manifestações clínicas dos pacientes com MSMD..	62
Figura 10. Avaliação do eixo IL-12/IFN- γ de pacientes com MSMD	62

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Manifestações clínicas dos pacientes com DGC.....	62
Tabela II. Pacientes com DGC avaliados para o eixo IL-12/IFN- γ	62
Tabela III. Histórico clínico dos pacientes com MSMD.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	48
1.1	Imunodeficiências primárias	48
1.1.1	Resposta a micobactérias.....	49
1.1.2	Infecção por micobactérias em pacientes com imunodeficiência primária	51
1.1.3	A vacina BCG.....	53
1.2	Características e classificação da DGC.....	53
1.2.1	A explosão respiratória na DGC.....	56
1.2.2	A explosão respiratória residual na DGC.....	57
1.2.3	Manifestações clínicas na DGC.....	58
1.2.4	Diagnóstico da DGC.....	59
1.2.5	Tratamento da DGC.....	59
1.2.6	Transplante de medula óssea na DGC.....	61
2	OBJETIVOS.....	62
2.1	Objetivo geral	62
2.2	Objetivos específicos.....	62
3	MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1.1	Caracterização clínica dos pacientes com DGC e MSMD	62
3.1.2	Critérios de inclusão e exclusão	62
3.2	Pacientes com DGC	62
3.2.1	Avaliações da explosão respiratória por DHR (Dihidrorodamina)	62
3.2.2	Análise do ensaio de DHR.....	62
3.2.3	Separação de leucócitos do sangue periférico (PBMC).....	62
3.3	Pacientes com DGC e MSMD	62
3.3.1	Avaliação do eixo IL-12/IFN- γ	62

3.3.2	Dosagem de citocinas pelo ensaio de ELISA.....	62
3.4	Caracterização genético-molecular dos pacientes	62
3.4.1	Extração de DNA genômico e reação em cadeia de polimerase (PCR)	62
3.4.2	Sequenciamento dos genes	62
3.5	Análise estatística	62
4	RESULTADOS	62
4.1	Pacientes DGC	62
4.1.1	Manifestação clínica dos pacientes DGC.....	62
4.1.2	A explosão respiratória dos pacientes DGC	62
4.1.3	Análise genético-molecular dos pacientes DGC.....	62
4.1.4	Análise estatística.....	62
4.1.5	Avaliação do eixo IL-12/IFN- γ dos pacientes com DGC (Sangue total)	62
4.1.6	Avaliação do eixo IL-12/IFN- γ em pacientes com DGC (PBMC).....	62
4.2	Pacientes com MSMD	62
4.2.1	Manifestações clínicas dos pacientes com MSMD.....	62
4.2.2	Avaliação do eixo IL-12/IFN- γ dos pacientes com MSMD	62
4.2.3	Análise estatística da avaliação do eixo IL-12/IFN- γ	62
4.2.4	Análise genético-molecular dos pacientes com MSMD.....	62
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	68
	REFERENCIAS	70
	ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imunodeficiências primárias

As imunodeficiências primárias (IDP) foram classificadas pela primeira vez sob o aval da Organização Mundial da Saúde (OMS) em maio de 1971, nela registraram-se diferentes desordens da imunidade, principalmente de células linfocíticas T e B. Atualmente, o número de registros cresceu notavelmente para 354 desordens distintas associadas a pelo menos 344 genes envolvidos nas diversas doenças. Dentro desta classificação encontram-se diferentes defeitos na imunidade, dentre os mais frequentes encontra-se a alteração da função das células B e da produção de anticorpos, a deficiência do sistema complemento e as alterações na função celular dos fagócitos e células T (Fontan Casariego 2001; Marciano and Holland 2017).

Os pacientes com imunodeficiências apresentam características clínicas que variam conforme a herança genética da doença, sexo e idade de diagnóstico do paciente. Na América Latina utilizam-se 10 principais manifestações clínicas na identificação das IDP em crianças. Estas manifestações foram adaptadas pelo grupo brasileiro de imunodeficiências (BRAGID), em correspondência com a fundação Jeffrey Modell (<http://www.info4pi.org/>), de forma que pudessem ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico de IDP no Brasil (**Figura 1**). A ocorrência no período de um ano de três ou mais das 10 manifestações clínicas, tais como: pneumonia, otite, estomatite, abscessos, infecção sistêmica grave, diarreia, asma, reação adversa a BCG, fenótipo de IDP e histórico familiar de IDP; pode levar a suspeita de uma possível alteração do sistema imune do paciente. Estes sintomas devem ser considerados como indicadores de IDP em casos clínicos onde a hipótese de imunodeficiência secundária como HIV e/ou outras potenciais causas da alteração da resposta imune, como transplante, imunossupressão, quimioterapia ou tratamento prolongado com corticosteroides tenham sido afastadas.

Os 10 Sinais de Alerta para Imunodeficiência Primária adaptados para o nosso meio são:

1. Duas ou mais Pneumonias no último ano
2. Oito ou mais novas Otites no último ano
3. Estomatites de repetição ou Monilíase por mais de dois meses
4. Abscessos de repetição ou ectima
5. Um episódio de infecção sistêmica grave (meningite, osteoartrite, septicemia)
6. Infecções intestinais de repetição / diarreia crônica
7. Asma grave, Doença do colágeno ou Doença auto-imune
8. Efeito adverso ao BCG e/ou infecção por Micobactéria
9. Fenótipo clínico sugestivo de síndrome associada a Imunodeficiência
10. História familiar de imunodeficiência

Adaptado da Fundação Jeffrey Modell e Cruz Vermelha Americana

Figura 1. Manifestações clínicas sugestivas de imunodeficiência primária. Fonte: BRAGID/Fundação Jeffrey Modell 2016.

1.1.1 *Resposta a micobactérias*

Sabe-se que o reconhecimento de *M. tuberculosis* por células fagocíticas leva à ativação celular, com a produção de citocinas, que desempenham um papel essencial na resposta inflamatória. O papel protetor das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 e IFN- γ está bem estabelecido. A eliminação de uma infecção causada pela *M. tuberculosis* depende principalmente do sucesso da interação entre macrófagos infectados e linfócitos T.

Em 1986, foi relatado que linfócitos T helper murinos (Th) podem ser divididos em dois subconjuntos: clones Th1, caracterizados pela produção de IFN- γ ; e os clones Th2, caracterizadas pela produção de IL-4 (Cherwinski, Schumacher et al. 1987; Fiorentino, Bond et al. 1989). Ambos os subconjuntos desenvolvem-se a partir de células T *naïves*, cuja diferenciação é influenciada pelo ambiente. A IL-12, produzida por macrófagos ativados e células dendríticas, é a principal citocina indutora da diferenciação de Th1 enquanto que a IL-4, produzida por células Th2 promove a indução De Th2 e de células B. Em infecções por micobactérias, citocinas de tipo Th1 parecem essenciais

para a imunidade protetora (Tebruegge, Dutta et al. 2015; Wergeland, Assmus et al. 2016). Cerca de três semanas após a infecção, uma resposta do tipo Th1 contra o bacilo é desenvolvida. As células T são estimuladas por antígenos de micobactérias, sendo estes apresentados no contexto de moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) pelas células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês: *Antigen Presenting Cells*). Células T sofrem ação da IL-12 produzida pelas APCs que entraram em contato com a micobactéria, tornando-se efetoras para produção de IFN- γ . O IFN- γ , por sua vez, ajudará na ativação de macrófagos para que estes tornem-se competentes para o combate à infecção (Modlin and Barnes 1995; Xing, Zganiacz et al. 2000; Ramirez-Alejo and Santos-Argumedo 2014).

A resposta Th1 pode resultar na formação de granulomas e necrose. Os macrófagos ativados, estimulados por IFN- γ , produzirão TNF- α , o qual poderá atuar sobre a migração de monócitos para o sítio de infecção. Os monócitos que migraram para o sítio de infecção podem diferenciar-se em células epitelióides, características da resposta granulomatosa. Em indivíduos saudáveis, este tipo de resposta contém o avanço da infecção pelas as bactérias e não causam destruição tecidual significativa. Em condições de imunossupressão, o avanço da infecção e a resposta imune subsequente resultam em destruição tecidual local formando granulomas e necrose caseosa (Yang, Cambier et al. 2012; Siamas and Khachemoune 2013). Desta forma, indivíduos que são deficientes em um dos componentes da imunidade mediada por células, sejam por doenças hereditárias ou adquiridas, apresentarão aumento da susceptibilidade a infecções por micobactérias (**Figura 2**).

e células dendríticas (Bustamante, Picard et al. 2007; Bustamante, Picard et al. 2011).

Estudos demonstram que a susceptibilidade a infecções por micobactérias sugerem um componente hereditário de mães para os filhos homens. De fato, mutações em genes ligados ao cromossomo X, como o *NEMO* e *CYBB*, também foram associadas a esta doença (Rosenzweig and Holland 2005).

Estudos sobre patógenos associados à MSMD descrevem, por exemplo, infecções severas por espécies como Citomegalovírus e vírus *Herpes zoster*. Outros patógenos isolados de pacientes com MSMD pertencem aos gêneros *Listeria*, *Klebsiella*, *Nocardia* e *Leishmania* além de *Histoplasma* e *Paracoccidioides*. Na literatura científica, ressalta-se a alta frequência das infecções provocadas pelo gênero *Salmonella*, levando à doença salmonelose não tifoide em pacientes com MSMD. Os sintomas de salmonelose foram relatados em quase metade dos pacientes com suscetibilidade mendeliana à micobactérias (Bustamante, Picard et al. 2011).

Uma das principais doenças raras envolvendo infecções por micobactérias é a Doença Granulomatosa Crônica (Prando-Andrade, Agudelo-Florez et al. 2004; Agudelo-Florez, Prando-Andrade et al. 2006; Bustamante, Picard et al. 2007; de Oliveira-Junior, Zurro et al. 2015). Bustamante e colaboradores (Bustamante, Arias et al. 2011) identificaram duas novas mutações, Q231P e T178P no gene *CYBB*, descritas em duas famílias não relacionadas que desenvolveram infecções por micobactérias. Seis indivíduos das famílias citadas acima apresentaram infecções causadas pela aplicação da vacina BCG e um sétimo indivíduo desenvolveu uma forma disseminada de tuberculose devido ao *M. tuberculosis* (Bustamante, Picard et al. 2007; Bustamante, Andres A. Arias et al. 2010). As duas mutações descritas conferem uma predisposição genética para novas infecções por micobactérias e, em particular pelo BCG e *M. tuberculosis*. Curiosamente, os indivíduos estudados apresentam defeito no “burst” oxidativo apenas em macrófagos derivados de monócitos *in vitro* e em células B transfectadas com EBV (EBV do inglês, *Epstein Bar Virus*), não observando-se comprometimento do “burst” oxidativo em granulócitos e em monócitos *ex vivo*. Contudo, é possível identificar pacientes com defeito no

“burst” oxidativo e com infecções causadas por micobactérias sem classificá-los como pacientes com MSMD.

1.1.3 A vacina BCG

Devido à ampla incidência mundial de infecções por micobactérias, a vacina baseada no bacilo Calmette-Guérin (BCG) surge como única medida efetiva na prevenção da tuberculose embora não a erradique completamente. A BCG é uma vacina baseada no *Micobacterium bovis* atenuado. Infecções causadas por esta vacina são relativamente raras, sendo relatadas, principalmente, em pacientes imunocomprometidos. Quando presentes em pacientes imunodeficientes, manifestam-se principalmente como BCGite, cuja reação caracteriza-se pela presença de úlcera, abscesso, fístula e adenite na região de inoculação da vacina. A BCGite pode causar uma reação mais grave chamada BCGose, onde a infecção dissemina-se afetando órgãos como pulmão, fígado e cérebro. A BCGose embora menos frequente, quando presente, está associada a uma alta mortalidade infantil (Deffert, Cachat et al. 2014).

1.2 Características e classificação da DGC

Dentre as imunodeficiências primárias que afetam a função celular dos fagócitos, encontramos a doença granulomatosa crônica (DGC) descrita como uma entidade clínica em 1957 em pacientes masculinos e, mais tarde, identificada também em pacientes femininos (Berendes, Bridges et al. 1957; Landing and Shirkey 1957; Bridges, Berendes et al. 1959). Esta doença caracteriza-se clinicamente como imunodeficiência grave e rara, com uma incidência de 1: 200.000 nascidos vivos por ano nos Estados Unidos (Winkelstein, Marino et al. 2000). A incidência varia de acordo com o país considerado, sendo que a menor foi observada em uma coorte italiana (1:1.000.000) (Martire, Rondelli et al. 2008), e as maiores incidências foram observadas em populações árabes e judias israelitas (1:111.000 e 1:218.000,

respectivamente) (Wolach, Gavrieli et al. 2008; Fattahi, Badalzadeh et al. 2011).

A causa da DGC reside na deficiência funcional do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. Este sistema consiste em duas subunidades transmembrana, a gp91^{-phox} e a p22^{-phox}, as quais compõem o citocromo *b*₅₅₈. Os componentes citosólicos do sistema são as proteínas p47^{-phox}, p67^{-phox}, p40^{-phox}, e as proteínas da família Rho com função GTPase, Rac1 e Rac2 (Clark 1999).

Aproximadamente 70% dos casos de DGC correspondem à forma ligada ao cromossomo X (DGC-X), a qual resulta de mutações no gene *CYBB* (subunidade β do citocromo *b*₅₅₈), gene que codifica a proteína gp91^{-phox}. A alteração de um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase caracteriza a forma autossômica recessiva da DGC (DGC-AR). Mutações nas proteínas p47^{-phox}, codificada pelo gene *NCF1* ("neutrophil cytosol factor 1"), e p67^{-phox}, codificada pelo gene *NCF2* ("neutrophil cytosol factor 2"), representam 30% e 6% dos casos de DGC, respectivamente. Alterações no componente p22^{-phox}, codificado pelo gene *CYBA* (subunidade α do citocromo *b*), no componente p40^{-phox}, codificado pelo gene *NCF4* ("neutrophil cytosol factor 2"), e na Rac2, dão origem aos demais casos de DGC (Dinauer and Orkin 1988; Parkos, Dinauer et al. 1988; Clark, Malech et al. 1989; Dinauer, Pierce et al. 1990; Clark 1999; Johnston 2001; Stasia and Li 2008; Matute, Arias et al. 2009) (**Figura 3**).

Figura 3. Representação gráfica da ativação do sistema NADPH oxidase na membrana dos fagócitos. Fonte: Clark, 1999.

A diversidade das mutações descritas e os múltiplos genes afetados explicam a heterogeneidade clínica apresentada por pacientes com DGC. As mutações do gene *CYBB*, causadas pela DGC ligada ao X, estão relacionadas a fenótipos mais graves do que aqueles presentes em pacientes com mutações nos genes de herança autossômica recessiva como o *NCF1*, o que pode sugerir a existência de atividade residual da NADPH oxidase nas células afetadas (Winkelstein, Marino et al. 2000).

Os defeitos genéticos que causam DGC ligada ao X, que afetam a função da proteína gp91^{phox}, incluem grandes deleções multigênicas, deleções e inserções menores, substituições do tipo *missense* e *nonsense*, bem como defeitos de “splicing” que provocam a deleção de um ou mais exons, este último defeito origina o fenótipo mais grave da doença. Até o momento, foram publicados três trabalhos científicos consecutivos descrevendo defeitos genéticos da DGC ligada ao X, nos quais são detalhados 681 mutações do tipo *missense*, *nonsense*, deleções, inserções e defeitos de *splicing* especificamente definidos (Heyworth, Curnutte et al. 2001; Roos, Kuhns et al. 2010; Roos, Kuhns et al. 2010).

Os casos de DGC autossômica que afetam as proteínas p22^{-phox} e p67^{-phox}, embora menos frequentes, são tão graves quanto os casos de DGC ligada ao X e se apresentam no genótipo dos pacientes com uma distribuição heterogênea ao longo dos genes. Entretanto, as mutações que levam à DGC autossômica por defeitos na proteína p47^{-phox} mostram uma distribuição homogênea no genoma dos pacientes DGC. A presença de uma região *hot spot* produto da recombinação com pseudogenes, provoca a deleção de 2 nucleotídeos (Δ GT), correspondentes às 4 primeiras bases no exon 2 do gene *NCF1* (Vazquez, Lehrnbecher et al. 2001; Roos, de Boer et al. 2006).

1.2.1 *A explosão respiratória na DGC*

As espécies reativas de oxigênio (EROS) tiveram sua relevância clínica demonstrada ao comprovar-se que fagócitos de pacientes com DGC apresentavam atividade microbicida defeituosa, resultado da baixa produção de superóxido, devido às mutações que afetavam componentes do sistema NADPH oxidase (Holmes, Quie et al. 1966; Holmes, Page et al. 1967; Babior 2004; Holland 2010).

A explosão respiratória ou *burst* oxidativo comprometida na DGC, é um mecanismo fundamental para a eficiência do sistema imune inato. A NADPH oxidase é responsável pela conversão catalítica do oxigênio molecular a ânion superóxido (O_2^-), por meio da passagem transmembrana de elétrons deste complexo enzimático para o oxigênio molecular (O_2). O ânion superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). A enzima mieloperoxidase (MPO) atua sobre este último composto transformando-o em ácido hipocloroso (HClO), um potente agente microbicida. Embora inativado nas células em repouso, esse processo é rapidamente ativado por estímulos inflamatórios e fisiológicos, tais como a fagocitose. Defeitos em quaisquer dos componentes envolvidos, levam à produção insuficiente de EROS, causando ação microbicida ineficiente e consequente recorrência de infecções (Fazal 1997; Wientjes, Segal et al. 1997; Dinauer,

Lekstrom-Himes et al. 2000; Segal and Holland 2000; Roos, van Bruggen et al. 2003).

1.2.2 *A explosão respiratória residual na DGC*

Sabe-se que as mutações no gene *CYBB*, que levam à DGC ligada ao X, dão origem a fenótipos mais graves do que os apresentados por pacientes com defeitos nos componentes autossômicos da NADPH oxidase, sugerindo que estes últimos determinam evolução mais benigna da DGC em virtude da existência de uma atividade NADPH oxidase residual (Winkelstein, Marino et al. 2000). No geral, os casos de DGC-AR 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 cuja geração de EROS é nula (Roos, de Boer et al. 1996; Agudelo-Florez, Prando-Andrade et al. 2006). Kuhns e colaboradores mostraram que pacientes com DGC que possuem produção residual de EROS apresentam forma menos grave da doença e maior probabilidade de sobrevivência de longo prazo do que pacientes com menor produção residual de EROS (Kuhns, Alvord et al. 2010).

Todavia, foi demonstrado que a função microbicida dos fagócitos encontra-se influenciada pela acidez (pH) fagossomal, o que afeta a atividade microbicida mediada por grânulos, ajudando a explicar o espectro microbiano de infecções que ocorrem na DGC. Por exemplo, *S. aureus*, *S. marcescens*, *S. asteróides* e *A. fumigatus* são resistentes ao pH ácido encontrado no fagossomo de neutrófilos de pacientes com DGC. Assim, a raridade da ocorrência de *C. albicans* em pacientes DGC pode ser devido ao fato deste agente patogênico ser suscetível à atividade microbicida não oxidativa em pH ácido encontrada no fagossomo dos neutrófilos de pacientes com DGC (Odell and Segal 1991; Henriët, Verweij et al. 2013). Além disso, estudos revelaram que a produção de EROS por fagócitos leva à atividade microbicida através da ativação de certas proteínas de grânulos primários localizados dentro de vacúolos fagocitários, o que sugere que as espécies reativas de oxigênio

também agem como moléculas de sinalização intracelular (Reeves, Lu et al. 2002).

1.2.3 *Manifestações clínicas na DGC*

A DGC caracteriza-se por infecções bacterianas e fúngicas recorrentes de início precoce, assim como por uma resposta inflamatória exacerbada que resulta na formação de granulomas (Leiding and Holland 2012). A ocorrência de infecções por bactérias catalase positivas como *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Nocardia* e *Serratia Marcescens* é comum em pacientes com DGC (Rosenzweig 2008; Friend, Hilligoss et al. 2009). Dentre das enterobactérias, as espécies de *Salmonella* documentaram-se frequentes em pacientes com DGC em países da America Latina (Segal, Leto et al. 2000).

As bactérias gram negativas, como a *B. cepacia*, são agentes comuns de pneumonia na DGC, e raramente de sepse, assim como a *B. gladioli* (Roos, de Boer et al. 1996; Winkelstein, Marino et al. 2000). Por outro lado, espécies como *Chromobacterium violaceum* e *Francisella philomiragia* foram documentadas como agentes causadores de sepse em indivíduos DGC no golfo de México e nos Estados Unidos respectivamente (Mailman and Schmidt 2005; Sirinavin, Techasaensiri et al. 2005). Recentemente, *Granulibacter bethesdensis* foi identificado como agente patogênico causador de linfadenite e sepse em pacientes DGC em lugares como Estados Unidos, Panamá e Espanha (Greenberg, Ding et al. 2006; Lopez, de Luna et al. 2008). Infecções por *Streptococcus* são raras em casos de DGC devido à natureza “catalase negativa” destes patógenos. Apesar disso, a literatura associa as espécies *Streptococcus intermedius* e *Hemophilus paraphropilus* com a formação de abscessos em pacientes portadores de DGC (Nagatomo, Ohga et al. 1999; Kottlil, Malech et al. 2003; Falcone and Holland 2012).

Infecções fúngicas oportunistas e invasivas por *Candida sp.*, *Paecilomyces sp.* e, principalmente, por *Aspergillus fumigatus* e *A. nidulans* são os principais responsáveis por infecções pulmonares e osteomielite. *A. nidulans* é também responsável por provocar severos danos no cérebro (Segal, Harper et al. 1982;

Tauber, Borregaard et al. 1983; Dotis and Roilides 2010; Henriët, Verweij et al. 2012; Leiding and Holland 2012).

1.2.4 **Diagnóstico da DGC**

O diagnóstico na DGC sofreu grandes mudanças nas últimas décadas. No passado, já foram utilizadas técnicas de avaliação da produção de ROS mediante emprego de imunohistoquímica, como no caso do ensaio de NBT (NBT do inglês, *Nitroblue Tetrazolium*), cujo resultado qualitativo avaliava a capacidade da redução do NBT pelos leucócitos após determinado estímulo celular como, por exemplo, o do PMA (do inglês: *phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Meerhof and Roos 1986). Outra técnica de diagnóstico de DGC é a avaliação da produção de anion superóxido dos leucócitos mediante a redução da molécula de citocromo c, após estímulo com PMA e inibição específica da enzima SOD. Atualmente, a técnica utilizada no diagnóstico de DGC é a avaliação de uma das espécies reativas de oxigênio, o peróxido de hidrogênio, por meio da molécula de DHR (do inglês: *Dihydrorhodamine 123*). Esta molécula, em presença de peróxido de hidrogênio, é reduzida à rodamina-123, a qual é excitável em comprimento de onda de 488 nm emitindo fluorescência a 515 nm (Rothe, Oser et al. 1988). Este último método tem como vantagens a necessidade de uso de pouco volume de sangue periférico de pacientes, a rapidez na aquisição dos resultados e a confiabilidade (Kim, Kim et al. 2013).

1.2.5 **Tratamento da DGC**

Pacientes com DGC devem receber imunizações de rotina, bem como a vacina anual contra influenza. Vacinas contendo microrganismos vivos atenuados, como a BCG, são contraindicadas, devido ao risco de reações adversas graves e potencialmente fatais em imunodeficientes (Prando-Andrade, Agudelo-Florez et al. 2004). Estudos sugerem que entre 9-58% dos pacientes DGC vacinados com BCG sofrem reação adversa à vacina (Fattahi, Badalzadeh et al. 2011; Yang, Cambier et al. 2012; Koker, Camcioglu et al.

2013; Zhou, Hui et al. 2018). Um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa que avaliou uma coorte de pacientes com DGC na América Latina mostrou que 30% dos pacientes apresentaram complicações devido à vacina BCG, variando de eventos loco regionais a eventos sistêmicos (de Oliveira-Junior, Zurro et al. 2015).

Os cuidados profiláticos são de extrema importância para os indivíduos com DGC. Estes cuidados incluem a prevenção das infecções por meio de imunizações, remoção das fontes de patógenos e o uso profilático de antibióticos. Os antibióticos com penetração intracelular como o trimetoprim-sulfametoxazole (5 mg/kg/dia) reduzem a frequência das infecções bacterianas, principalmente aquelas de origem estafilococal, diminuindo também a frequência de infecções fúngicas (Margolis, Melnick et al. 1990; Holland 2010). O uso de azoles é de vital importância para a redução da severidade das infecções fúngicas. Assim, a profilaxia com itraconazol tem sido altamente recomendada como tratamento a pacientes DGC (Gallin, Alling et al. 2003; Segal, Barnhart et al. 2005).

O uso do IFN- γ no tratamento de pacientes com DGC foi grandemente estimulado devido aos resultados encontrados em estudo internacional multicêntrico, os quais mostraram que a utilização terapêutica desta citocina em pacientes DGC diminuiu a frequência e a gravidade das infecções nestes pacientes em 70% quando comparadas às observadas em grupos de pacientes que receberam placebo. Curiosamente, o estudo não mostrou a existência de diferenças significativas entre o grupo de pacientes tratados com IFN- γ e o grupo tratado com placebo com relação à produção de ROS ou à atividade bactericida *in vitro*. Atualmente, o uso de IFN- γ é parte do regime de tratamento empregado na maioria dos centros de saúde dos Estados Unidos (Errante, Frazao et al. 2008), todavia o uso desta citocina no Brasil ainda não foi aprovado pela Agencia Nacional de Vigilância à Saúde (ANVISA).

1.2.6 *Transplante de medula óssea na DGC*

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (do inglês: *Hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT), tanto de doadores compatíveis como de doadores não compatíveis, tem sido uma opção bem sucedida ao longo dos anos para diversas imunodeficiências como, por exemplo, para a síndrome de Wiskott-Aldrich e para imunodeficiência combinada grave (Satwani, Cooper et al. 2008; Roifman, Fischer et al. 2010). Em pacientes com DGC, o estabelecimento de condições mieloablativas, após o ano de 1985, tem resultado em HSCT bem sucedidos para estes pacientes (Hassan, Ljungman et al. 1994; Remberger and Sundberg 2004; Ahlin, Fugelang et al. 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterização clínica, bioquímica e molecular de pacientes com DGC e susceptibilidade mendeliana a infecção por micobactéria (MSMD).

2.2 Objetivos específicos

- Diagnóstico clínico e bioquímico dos pacientes com DGC mediante avaliação de explosão respiratória dos granulócitos;
- Avaliação da produção de citocinas do eixo IL-12/IFN- γ a partir do sangue periférico e PBMC dos pacientes com DGC estimulados com lisado de micobactéria (LM), proteína purificada (PPD) e Bacilo Calmette-Guérin (BCG);
- Diagnóstico clínico e bioquímico dos pacientes MSMD mediante dosagem de citocinas do eixo IL-12/IFN- γ estimulados com lisado de micobactéria (LM), proteína purificada (PPD) e Bacilo Calmette-Guérin (BCG);
- Caracterização genético-molecular dos pacientes DGC e MSMD mediante sequenciamento de genes.

3 DISCUSSÃO

A DGC é caracterizada como uma imunodeficiência causada pela diminuição ou ausência da função do sistema NADPH oxidase, o que resulta na diminuição ou ausência de produção de espécies reativas de oxigênio (Jakobsen, Katzenstein et al. 2012). As infecções frequentes em pacientes com defeitos no sistema NADPH oxidase variam de acordo com os fatores geográficos e ambientais de cada região. Na América Latina, um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa permitiu caracterizar o fenótipo e genótipo de uma coorte de 71 pacientes com DGC, contribuindo para um melhor entendimento desta doença nesta região (de Oliveira-Junior, Zurro et al. 2015).

Infecções por fungos invasivos integram a lista de patógenos com maior prevalência na DGC, comparando-se esta doença com as outras imunodeficiências primárias. Estes acometem pacientes principalmente nas suas primeiras duas décadas de vida, com uma incidência entre 20 e 40% dos pacientes com DGC (Beaute, Obenga et al. 2011; Blumental, Mouy et al. 2011). Um paciente estudado no presente trabalho de pesquisa (P11) apresentou infecções por *A. fumigatus*

As infecções por estafilococos são as mais comuns nos pacientes DGC, isso deve-se, pelo menos em parte, a uma baixa expressão de receptores da imunidade inata, tais como TLR5, TLR9, CD11b, CD18 e CXCR1G, nestes pacientes. A deficiência do receptor de TLR5 leva a ativação de neutrófilos deficiente em presença de bactérias flageladas. Resultados similares foram observados na redução das moléculas CD11b/CD18, estreitamente relacionadas a defeitos na fagocitose de *S. aureus* (Hartl, Lehmann et al. 2008; Rieber, Hector et al. 2012).. O histórico clínico de nossos pacientes com DGC mostrou que 6 deles (26% dos casos) apresentaram abscessos de pele, sendo que em apenas um dos pacientes foi isolado *S. aureus*.

A formação de granulomas e a inflamação desregulada no trato gastrointestinal são manifestações comuns em pacientes com DGC. Edema pilórico e granulomas esofágicos, de jejuno, íleo e reto, similares aos descritos para a doença de *Crohn*, já foram relatados em pacientes com

DGC. Dentre os sintomas mais indicativos de DGC, podem ser citadas a ocorrência de colite, dores abdominais e a formação de fístulas (Mitomi, Mikami et al. 1999; Schappi, Smith et al. 2001) Concordando com o observado na literatura, quatro dos pacientes estudados no presente trabalho de pesquisa (17% dos casos) relataram pelo menos um evento de colite aguda, e este foi associado à perda de peso por estes pacientes.

Casos de osteomielite são frequentes nos pacientes DGC devido à exacerbação da inflamação e infecção descontrolada por espécies como *Aspergillus sp.* e *Serratia sp.* Estes patógenos possuem como sítios de infecções mais comuns as costelas, vértebras, fêmur, tálus e tíbia. A infecção óssea por estes patógenos afeta o crescimento dos pacientes em 75% dos casos (Jones, McGrogan et al. 2008; van den Berg, van Koppen et al. 2009) Dentre os pacientes estudados neste trabalho que possuíam infecção causada por estes patógenos, somente um sofreu com aspergilose severa de difícil tratamento.

A vacina BCG é administrada em diversos países e apresenta raras reações adversas. *Mycobacterium bovis* e o Bacilo Calmette-Guérin podem causar infecção em indivíduos imunocomprometidos, cujos fagócitos não são capazes de combater estes agentes. Infecções causadas por estes patógenos são encontradas podem ser observadas em 30% dos casos de DGC na América Latina. Em quatro dos 16 pacientes diagnosticados registrou-se adenite pós-vacinal a BCG (BCGite), um paciente apresentou também BCGose severa. Uma mutação nova no gene *CYBB* (P15; 376T>C), foi descritas por nosso grupos em um paciente com DGC e BCGite (de Albuquerque, de Oliveira Junior et al. 2018).

A forma mais comum da DGC é causada por mutações no gene *CYBB* que codifica a proteína gp91^{-phox}, trabalhos publicados por Roos et al (Heyworth, Curnutte et al. 2001; Roos, Kuhns et al. 2010; Roos, Kuhns et al. 2010) adicionaram 338 novas mutações identificadas a um total de 681 diferentes em 1267 casos não relacionados. As mutações no gene *CYBB* incluem deleções (35,6%) mutações do tipo *missense* (21,3%), no sítio de *splicing* (17,6%) e mutações *nonsense* (14,1%). Entre as mutações

identificadas no grupo de pacientes estudados no presente trabalho, uma deleção foi identificada em um dos pacientes (P10; 1679delG) no gene *CYBB*. Identificamos outras seis diferentes mutações *missense* no gene *CYBB* nos pacientes: P3 (c.431C>T), P6 (c.483G>A), P7 (c.125A>C) P14 (c.1022T>T) e uma mutação nova, sendo então publicado por nosso grupo de pesquisa (P1; c.951T>A) (Zurro, de Albuquerque et al. 2018). Dois dos pacientes estudados apresentaram defeito genético do tipo *nonsense* no gene *CYBB* (P2; c.676C>T; e P8; c.752G>A).

O defeito genético predominante em pacientes com DGC autossômica é a deleção GT no início do exon 2 do gene *NCF1*. A presença de dois pseudogenes (*NCF1B* e *NCF1C*) dificulta a identificação da mutação devido à homologia de 98% que estes pseudogenes compartilham com o gene funcional *NCF1*. Os eventos recombinantes entre o gene *NCF1* e seus os pseudogenes flanqueantes, tais como a deleção c75_76delGT, podem resultar na incorporação de deleções a um alelo do gene *NCF1*, segundo trabalho publicado por Gorlach et al (Gorlach, Lee et al. 1997). A mutação c75_76delGT foi identificada em pacientes estudados no presente trabalho de pesquisa, em três pacientes do sexo feminino (P18; P19; P20) e em um paciente do sexo masculino (P5), irmão de uma das pacientes (P20). Outra mutação no gene *NCF1* (C.295A>G) foi identificada em uma das pacientes (P21), no exon 4 deste gene.

Por outro lado, as formas de DGC-AR que compreendem mutações no gene *CYBA* (Roos, Kuhns et al. 2010; Leiding and Holland 2012) e aquelas descritas nos genes *NCF2* e *NCF4* não foram achadas na coorte de nossos pacientes estudados no período de 2014-2018, embora na primeira etapa de nosso trabalho uma das pacientes feminina tenha apresentado uma mutação no gene *CYBA* (2012-2014) (Tabela II).

Alguns casos de pacientes com DGC apresentam reação adversa a BCG o que pode ser um indício de MSMD. Em nosso estudo, avaliamos o eixo IL-12/IFN- γ em 12 pacientes com DGC a partir de amostras de sangue total. Embora com resultados estatisticamente não significativos,, observamos que alguns dos pacientes avaliados mantinham um padrão de resposta

diminuída e constante quando comparados aos controles sadios. A maior parte dos pacientes DGC com produção muito baixa de citocinas IL-12 e IFN- γ foram pacientes com histórico clínico de BCGite. Os pacientes com resultados do eixo IL-12/IFN- γ que não apresentaram reação adversa a vacina BCG, demonstram a heterogeneidade na resposta imunológica a vacinas em pacientes com IDP. Curiosamente, o único paciente com DGC com resultados alterados na produção de citocinas frente ao estímulo de BCG, não apresentou BCGite.

Pacientes com susceptibilidade mendeliana a micobactérias não tuberculosas apresentam problemas graves de infecções devido a problemas de sinalização no eixo IL-12/IFN- γ . Nestes pacientes, a vacina BCG e as micobactérias não tuberculosas ambientais podem causar MSMD de modo grave, podendo, inclusive, levar o paciente a óbito (Casanova and Abel 2002). Diversos genes já foram descritos como responsáveis do fenótipo MSMD. Estas mutações foram identificadas nos genes *IFNGR1* e *IFNGR2*, que codificam as duas cadeias do receptor de IFN- γ ; no *STAT1*, um fator de transcrição; no *IL12B*, que codifica a subunidade p40 da IL-12; e no *IL12RB1*, que codifica a cadeia β 1 do receptor de IL-12 expressa nas células NK e T; e no gene *IRF8*, um fator regulador induzível pelo IFN- γ e que provoca a alteração na produção de IL-12 por monócitos e células dendríticas (Bustamante, Picard et al. 2007; Bustamante, Picard et al. 2011) (Doffinger, Smahi et al. 2001; Haverkamp, van Dissel et al. 2006).

A avaliação dos pacientes com histórico clínico sugestivo de MSMD nos levou a identificar nove pacientes com alteração nas citocinas IL-12 e IFN- γ . (Tabela III) Em dois pacientes (P3 e P9) foi achada a mutação no receptor da citocina IL17, curiosamente os dois apresentaram infecção pelo vírus *Herpes zoster*. O P3 apresentou também inúmeras infecções e complicações que o levaram a óbito aos 22 anos.

No caso dos pacientes irmãos P7 e P8, um deles desenvolveu reação grave à vacina BCG e o outro irmão foi diagnosticado com uma hiperplasia de linfonodos persistente. Em ambos pacientes foi identificada a mesma mutação no gene codificante do receptor da IL-12 (c.434_435insA).

Um paciente com abscesso cerebral apresentou uma mutação também no gene codificante do receptor da IL-12 (c.191A>G). Estes casos confirmam dados prévios encontrados na literatura que relacionam variantes genéticas do *IL12R* à uma menor gravidade da MSMD.

4 CONCLUSÕES

A caracterização clínica dos pacientes com DGC permitiu diagnosticar 23 indivíduos com falha na explosão respiratória dos fagócitos. As manifestações clínicas mais frequentes foram pneumonia, abscessos e infecções de pele. Os patógenos isolados nestes pacientes foram principalmente as bactérias *B. cepacia* e *S. aureus*, assim como os fungos oportunistas do gênero *Candida*. e *Aspergillus*.

A resposta do eixo IL-12/IFN- γ nos pacientes com DGC frente aos estímulos do LM, PPD e BCG apresentou-se heterogênea, mas os dados obtidos não se mostraram estatisticamente diferentes daqueles observados nos controles saudáveis.

A análise genético-molecular dos pacientes com DGC possibilitou a caracterização dos defeitos genéticos de 14 pacientes, nove pacientes do sexo masculino, com mutações no gene *CYBB* (DGC-X). Cinco pacientes foram identificados com a mesma mutação no gene *NCF1* (DGC-AR), 4 do sexo feminino e 1 do sexo masculino.

A análise genético-molecular dos pacientes com diagnóstico sugestivo de MSMD permitiu diagnosticar 16 pacientes com alterações genéticas no eixo IL-12/IFN- γ . As principais manifestações clínicas observadas nestes pacientes foram: hiperplasia de linfonodos, infecções de pele e diarreia. Micobactérias não tuberculosas e patógenos pertencentes aos gêneros paracoccidioides e *Cryptococcus* foram isolados desses pacientes. Dois pacientes apresentaram infecção pelo vírus *Herpes zoster*.

A avaliação da atividade do eixo IL-12/IFN- γ frente aos estímulos do LM, PPD e BCG dos pacientes diagnosticados com MSMD revelaram resultados estatisticamente diferentes daqueles obtidos em amostras dos controles saudáveis.

A análise genético-molecular dos pacientes com MSMD permitiu caracterizar cinco mutações, duas no gene *IL17RA* e 3 no gene *IL12R1B*, nos pacientes investigados.

REFERENCIAS

- Agudelo-Florez, P., C. C. Prando-Andrade, et al. (2006). "Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics." Pediatr Blood Cancer **46**(2): 243-52.
- Ahlin, A., J. Fugelang, et al. (2013). "Chronic granulomatous disease - haematopoietic stem cell transplantation versus conventional treatment." Acta Paediatr **102**(11): 1087-94.
- Babior, B. M. (2004). "NADPH oxidase." Curr Opin Immunol **16**(1): 42-7.
- Beaute, J., G. Obenga, et al. (2011). "Epidemiology and outcome of invasive fungal diseases in patients with chronic granulomatous disease: a multicenter study in France." Pediatr Infect Dis J **30**(1): 57-62.
- Berendes, H., R. A. Bridges, et al. (1957). "A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome." Minn Med **40**(5): 309-12.
- Blumental, S., R. Mouy, et al. (2011). "Invasive mold infections in chronic granulomatous disease: a 25-year retrospective survey." Clin Infect Dis **53**(12): e159-69.
- Bridges, R. A., H. Berendes, et al. (1959). "A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome." AMA J Dis Child **97**(4): 387-408.
- Bustamante, J., Andres A. Arias, et al. (2010). "Germline but macrophage-tropic CYBB mutations in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial diseases." Science - em revisão.
- Bustamante, J., A. A. Arias, et al. (2011). "Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease." Nat Immunol **12**(3): 213-21.
- Bustamante, J., C. Picard, et al. (2011). "Genetic lessons learned from X-linked Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases." Ann N Y Acad Sci **1246**: 92-101.
- Bustamante, J., C. Picard, et al. (2007). "A novel X-linked recessive form of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease." J Med Genet **44**(2): e65.
- Casanova, J. L. and L. Abel (2002). "Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model." Annu Rev Immunol **20**: 581-620.
- Cherwinski, H. M., J. H. Schumacher, et al. (1987). "Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies." J Exp Med **166**(5): 1229-44.
- Clark, R. A. (1999). "Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase." J Infect Dis **179 Suppl 2**: S309-17.
- Clark, R. A., H. L. Malech, et al. (1989). "Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system." N Engl J Med **321**(10): 647-52.
- de Albuquerque, J. A. T., E. B. de Oliveira Junior, et al. (2018). "A C126R de novo Mutation in CYBB Leads to X-linked Chronic Granulomatous Disease With Recurrent Pneumonia and BCGitis." Front Pediatr **6**: 248.
- de Oliveira-Junior, E. B., N. B. Zurro, et al. (2015). "Clinical and genotypic spectrum of chronic granulomatous disease in 71 Latin American patients: First report from the LASID registry." Pediatr Blood Cancer.
- Deffert, C., J. Cachat, et al. (2014). "Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections." Cell Microbiol **16**(8): 1168-78.

- Dinauer, M. C., J. A. Lekstrom-Himes, et al. (2000). "Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 303-318.
- Dinauer, M. C. and S. H. Orkin (1988). "Molecular genetics of chronic granulomatous disease." Immunodef Rev **1**(1): 55-69.
- Dinauer, M. C., E. A. Pierce, et al. (1990). "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 **86**(5): 1729-37.
- Doffinger, R., F. Altare, et al. (2000). "Genetic heterogeneity of Mendelian susceptibility to mycobacterial infection." Microbes Infect **2**(13): 1553-7.
- Doffinger, R., A. Smahi, et al. (2001). "X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling." Nat Genet **27**(3): 277-85.
- Dotis, J. and E. Roilides (2010). "Osteomyelitis due to *Aspergillus* species in chronic granulomatous disease: an update of the literature." Mycoses **54**(6): e686-96.
- Errante, P. R., J. B. Frazao, et al. (2008). "The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease." Recent Pat Antiinfect Drug Discov **3**(3): 225-30.
- Falcone, E. L. and S. M. Holland (2012). "Streptococcal infections in patients with chronic granulomatous disease: case report and review of the literature." J Clin Immunol **33**(2): 310.
- Fattahi, F., M. Badalzadeh, et al. (2011). "Inheritance pattern and clinical aspects of 93 Iranian patients with chronic granulomatous disease." J Clin Immunol **31**(5): 792-801.
- Fazal, N. (1997). "The role of reactive oxygen species (ROS) in the effector mechanisms of human antimycobacterial immunity." Biochem Mol Biol Int **43**(2): 399-408.
- Feinberg, J., C. Fieschi, et al. (2004). "Bacillus Calmette Guerin triggers the IL-12/IFN-gamma axis by an IRAK-4- and NEMO-dependent, non-cognate interaction between monocytes, NK, and T lymphocytes." Eur J Immunol **34**(11): 3276-84.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, et al. (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J Exp Med **170**(6): 2081-95.
- Fontan Casariego, G. (2001). "[Primary immunodeficiencies. Clinical features and variant forms]." Allergol Immunopathol (Madr) **29**(3): 101-7.
- Friend, J. C., D. M. Hilligoss, et al. (2009). "Skin ulcers and disseminated abscesses are characteristic of *Serratia marcescens* infection in older patients with chronic granulomatous disease." J Allergy Clin Immunol **124**(1): 164-6.
- Gallin, J. I., D. W. Alling, et al. (2003). "Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease." N Engl J Med **348**(24): 2416-22.
- Gorlach, A., P. L. Lee, et al. (1997). "A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox- deficient chronic granulomatous disease." J Clin Invest **100**(8): 1907-18.
- Greenberg, D. E., L. Ding, et al. (2006). "A novel bacterium associated with lymphadenitis in a patient with chronic granulomatous disease." PLoS Pathog **2**(4): e28.
- Hartl, D., N. Lehmann, et al. (2008). "Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease." J Allergy Clin Immunol **121**(2): 375-382 e9.
- Hassan, M., P. Ljungman, et al. (1994). "Busulfan bioavailability." Blood **84**(7): 2144-50.
- Haverkamp, M. H., J. T. van Dissel, et al. (2006). "Human host genetic factors in nontuberculous mycobacterial infection: lessons from single gene disorders affecting innate and adaptive immunity and lessons from molecular defects in interferon-gamma-dependent signaling." Microbes Infect **8**(4): 1157-66.
- Henriet, S., P. E. Verweij, et al. (2013). "Invasive fungal infections in patients with chronic granulomatous disease." Adv Exp Med Biol **764**: 27-55.

- Henriet, S. S., P. E. Verweij, et al. (2012). "Aspergillus nidulans and chronic granulomatous disease: a unique host-pathogen interaction." *J Infect Dis* **206**(7): 1128-37.
- Heyworth, P. G., J. T. Curnutte, et al. (2001). "Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update)." *Blood Cells Mol Dis* **27**(1): 16-26.
- Holland, S. M. (2010). "Chronic granulomatous disease." *Clin Rev Allergy Immunol* **38**(1): 3-10.
- Holmes, B., A. R. Page, et al. (1967). "Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function." *J Clin Invest* **46**(9): 1422-32.
- Holmes, B., P. G. Quie, et al. (1966). "Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function." *Lancet* **1**(7449): 1225-8.
- Jakobsen, M. A., T. L. Katzenstein, et al. (2012). "Genetical analysis of all Danish patients diagnosed with chronic granulomatous disease." *Scand J Immunol* **76**(5): 505-11.
- Johnston, R. B., Jr. (2001). "Clinical aspects of chronic granulomatous disease." *Curr Opin Hematol* **8**(1): 17-22.
- Jones, L. B., P. McGrogan, et al. (2008). "Special article: chronic granulomatous disease in the United Kingdom and Ireland: a comprehensive national patient-based registry." *Clin Exp Immunol* **152**(2): 211-8.
- Kim, H. Y., H. J. Kim, et al. (2013). "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* **33**(4): 288-92.
- Koker, M. Y., Y. Camcioglu, et al. (2013). "Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients." *J Allergy Clin Immunol* **132**(5): 1156-1163 e5.
- Kottlilil, S., H. L. Malech, et al. (2003). "Infections with Haemophilus species in chronic granulomatous disease: insights into the interaction of bacterial catalase and H₂O₂ production." *Clin Immunol* **106**(3): 226-30.
- Kuhns, D. B., W. G. Alvord, et al. (2010). "Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease." *N Engl J Med* **363**(27): 2600-10.
- Landing, B. H. and H. S. Shirkey (1957). "A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes." *Pediatrics* **20**(3): 431-8.
- Leiding, J. W. and S. M. Holland (2012). "Chronic Granulomatous Disease."
- Lopez, F. C., F. F. de Luna, et al. (2008). "Granulibacter bethesdensis isolated in a child patient with chronic granulomatous disease." *J Infect* **57**(3): 275-7.
- Mailman, T. L. and M. H. Schmidt (2005). "Francisella philomiragia adenitis and pulmonary nodules in a child with chronic granulomatous disease." *Can J Infect Dis Med Microbiol* **16**(4): 245-8.
- Marciano, B. E. and S. M. Holland (2017). "Primary Immunodeficiency Diseases: Current and Emerging Therapeutics." *Front Immunol* **8**: 937.
- Margolis, D. M., D. A. Melnick, et al. (1990). "Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease." *J Infect Dis* **162**(3): 723-6.
- Martire, B., R. Rondelli, et al. (2008). "Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: an Italian multicenter study." *Clin Immunol* **126**(2): 155-64.
- Matute, J. D., A. A. Arias, et al. (2009). "A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity." *Blood* **114**(15): 3309-15.
- Meerhof, L. J. and D. Roos (1986). "Heterogeneity in chronic granulomatous disease detected with an improved nitroblue tetrazolium slide test." *J Leukoc Biol* **39**(6): 699-711.

- Mitomi, H., T. Mikami, et al. (1999). "Colitis in chronic granulomatous disease resembling Crohn's disease: comparative analysis of CD68-positive cells between two disease entities." Dig Dis Sci **44**(2): 452-6.
- Modlin, R. L. and P. F. Barnes (1995). "IL12 and the human immune response to mycobacteria." Res Immunol **146**(7-8): 526-31.
- Nagatomo, T., S. Ohga, et al. (1999). "Streptococcus intermedius-brain abscess in chronic granulomatous disease." Eur J Pediatr **158**(10): 872-3.
- Odell, E. W. and A. W. Segal (1991). "Killing of pathogens associated with chronic granulomatous disease by the non-oxidative microbicidal mechanisms of human neutrophils." J Med Microbiol **34**(3): 129-35.
- Parkos, C. A., M. C. Dinauer, et al. (1988). "Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(10): 3319-23.
- Patino, P. J., J. E. Perez, et al. (1999). "Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-phox." Hum Mutat **13**(1): 29-37.
- Prando-Andrade, C., P. Agudelo-Florez, et al. (2004). "[Autosomal chronic granulomatous disease: case report and mutation analysis of two Brazilian siblings]." J Pediatr (Rio J) **80**(5): 425-8.
- Ramirez-Alejo, N. and L. Santos-Argumedo (2014). "Innate defects of the IL-12/IFN-gamma axis in susceptibility to infections by mycobacteria and salmonella." J Interferon Cytokine Res **34**(5): 307-17.
- Reeves, E. P., H. Lu, et al. (2002). "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux." Nature **416**(6878): 291-7.
- Remberger, M. and B. Sundberg (2004). "Cytokine production during myeloablative and reduced intensity therapy before allogeneic stem cell transplantation." Haematologica **89**(6): 710-6.
- Rieber, N., A. Hector, et al. (2012). "Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease." Clin Dev Immunol **2012**: 252460.
- Roifman, C. M., A. Fischer, et al. (2010). "Indications for hemopoietic stem cell transplantation." Immunol Allergy Clin North Am **30**(2): 261-2.
- Roos, D., M. de Boer, et al. (2006). "Chronic granulomatous disease caused by mutations other than the common GT deletion in NCF1, the gene encoding the p47phox component of the phagocyte NADPH oxidase." Hum Mutat **27**(12): 1218-29.
- Roos, D., M. de Boer, et al. (1996). "Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease." Blood **87**(5): 1663-81.
- Roos, D., D. B. Kuhns, et al. (2010). "Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update)." Blood Cells Mol Dis **44**(4): 291-9.
- Roos, D., D. B. Kuhns, et al. (2010). "Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update)." Blood Cells Mol Dis.
- Roos, D., R. van Bruggen, et al. (2003). "Oxidative killing of microbes by neutrophils." Microbes Infect **5**(14): 1307-15.
- Rosenzweig, S. D. (2008). "Inflammatory manifestations in chronic granulomatous disease (CGD)." J Clin Immunol **28 Suppl 1**: S67-72.
- Rosenzweig, S. D. and S. M. Holland (2005). "Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways." Immunol Rev **203**: 38-47.
- Rothe, G., A. Oser, et al. (1988). "Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes." Naturwissenschaften **75**(7): 354-5.

- Satwani, P., N. Cooper, et al. (2008). "Reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation in childhood malignant and nonmalignant diseases." Bone Marrow Transplant **41**(2): 173-82.
- Schappi, M. G., V. V. Smith, et al. (2001). "Colitis in chronic granulomatous disease." Arch Dis Child **84**(2): 147-51.
- Segal, A. W., A. M. Harper, et al. (1982). "The action of cells from patients with chronic granulomatous disease on *Staphylococcus aureus*." J Med Microbiol **15**(4): 441-9.
- Segal, B. H., L. A. Barnhart, et al. (2005). "Posaconazole as salvage therapy in patients with chronic granulomatous disease and invasive filamentous fungal infection." Clin Infect Dis **40**(11): 1684-8.
- Segal, B. H. and S. M. Holland (2000). "Primary phagocytic disorders of childhood." Pediatr Clin North Am **47**(6): 1311-38.
- Segal, B. H., T. L. Leto, et al. (2000). "Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease." Medicine (Baltimore) **79**(3): 170-200.
- Siamas, K. and A. Khachemoune (2013). "Mycobacteria infection in an immunocompetent patient with no risk factors: evaluation and management of non-healing majocchi granuloma-type nodule." Dermatol Online J **19**(8): 19260.
- Sirinavin, S., C. Techasaensiri, et al. (2005). "Invasive *Chromobacterium violaceum* infection in children: case report and review." Pediatr Infect Dis J **24**(6): 559-61.
- Stasia, M. J. and X. J. Li (2008). "Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease." Semin Immunopathol **30**(3): 209-35.
- Tauber, A. I., N. Borregaard, et al. (1983). "Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies." Medicine (Baltimore) **62**(5): 286-309.
- Tebuegge, M., B. Dutta, et al. (2015). "Mycobacteria-Specific Cytokine Responses Detect Tuberculosis Infection and Distinguish Latent from Active Tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **192**(4): 485-99.
- van den Berg, J. M., E. van Koppen, et al. (2009). "Chronic granulomatous disease: the European experience." PLoS One **4**(4): e5234.
- Vazquez, N., T. Lehrnbecher, et al. (2001). "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 **29**(2): 234-43.
- Volpp, B. D., W. M. Nauseef, et al. (1988). "Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease." Science **242**(4883): 1295-7.
- Wergeland, I., J. Assmus, et al. (2016). "Cytokine Patterns in Tuberculosis Infection; IL-1ra, IL-2 and IP-10 Differentiate Borderline QuantiFERON-TB Samples from Uninfected Controls." PLoS One **11**(9): e0163848.
- Wientjes, F. B., A. W. Segal, et al. (1997). "Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane." J Leukoc Biol **61**(3): 303-12.
- Winkelstein, J. A., M. C. Marino, et al. (2000). "Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients." Medicine (Baltimore) **79**(3): 155-69.
- Wolach, B., R. Gavrieli, et al. (2008). "Chronic granulomatous disease in Israel: clinical, functional and molecular studies of 38 patients." Clin Immunol **129**(1): 103-14.
- Xing, Z., A. Zganiacz, et al. (2000). "Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction." J Leukoc Biol **68**(6): 897-902.
- Yang, C. T., C. J. Cambier, et al. (2012). "Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages." Cell Host Microbe **12**(3): 301-12.

Zhou, Q., X. Hui, et al. (2018). "A Cohort of 169 Chronic Granulomatous Disease Patients Exposed to BCG Vaccination: a Retrospective Study from a Single Center in Shanghai, China (2004-2017)." J Clin Immunol **38**(3): 260-272.

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@icb.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)

Paciente encaminhado pela Instituição:					
Cidade, estado:					
Nome do Médico responsável:					
Nome Completo do paciente		Data de Nascimento:		Sexo:	
Heredograma: Preenchimento obrigatório de pelo menos duas gerações.					
Consangüinidade Sim () Não () Tipo _____		Nº. Gesta da mãe: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10		No. filhos: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	
				Sadios: Sim () Não () Infecções de repetição: Sim () Não ()	
Antecedentes Familiares					
Falecimentos precoces Sim () Não ()		Parentesco _____ Idade de óbito _____		Diagnóstico de IDP Sim () Não () DGC Sim () Não () Outra _____	
Ração do falecimento do familiar:					
Vacinas BCG Sim () Não () Não especificado: Idade de aplicação:		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: Qual vacina _____ Manifestação _____		
DNPM		BDNPM S () N () NE*		RDNPM S () N () NE*. Detalhar: Sentou com apoio 1 ano, sem apoio 1 ano 1 mês	
DPE		>p90% S () N () <p10% S () N ()		>p10% e <p90% S () N ()	
1ª manifestação			Motivo de Estudo		

Idade ____ ano ____ meses	Local:		Infec. Repetição Sim () Não () Manifest. Grave Sim () Não () História Familiar Sim () Não () Outro Sim () Não (). Especificar: _____		
Manifestações Preenchimento obrigatorio	Número de episódios	Microorg. isolado Sim () Não () Colocar nome do Microorganismo	Idade do paciente em cada episódio e data em cada uma das manifestações	Localização	
1 Otite					
2 Pneumonia					
3 Pneumonia / DP					
3 Amigdalite					
4 Linfonodo (Hiperplasia)					
5 ITU					
6 Meningite					
7 Artrite					
8 Osteomielite					
9 Diarréia					
10 Infecções de Pele Especificar:					
11 Artrite					
12 Seps					
13 Colangite esclerosante					
14 Autoimunidade					
15 Outras					
Granulomas Sim () Não ()	Nº episódios:	Localização:		Microorg. Isolado:	Numero de Hospitalizações:
Exames Laboratoriais: Preenchimento obrigatório					
HIV: Sim () Não () NE () Data do diagnóstico:					
HMG	Hb	Leucocitos	NT	LT	PLQ
Linfócitos/mm ³ Colocar em valores absolutos Data da dosagem: Infecção na data de dosagem? Qual?	CD3	CD4	CD8	CD19	CD16/56
Dosagem de Imunoglobulinas (Colocar os valores antes da primeira reposição de Gama)	IgG	IgM	IgA	IgE	

DATA da dosagem:				
Complemento	C3	C4	CH50	
DHR	Monócitos	Granulócitos	NBT	
Espontâneo			Repouso	Estimulado
Estimulado (PMA)				
Tratamento 1 IFN γ 2 ITRA 3 FLUCO 4 SMX +TMP 5 Prednisona 6 TMO 7 7. Gama (data de início)	Administração Sim () Não () Data de início _____	Tratamento atual Sim () Não ()	Óbito Sim () Não () Idade _____	Causa 1 Conhecida 2 Desconhecida
	_____		Autópsia Sim () Não ()	Laud

OUTRAS MANIFESTAÇÕES – LIVRE RELATO DE OCORRÊNCIAS

[illegible]