

CAROLINA CARDOSO DE MELLO PRANDO

**O PAPEL CRUCIAL DO EIXO IL12/23-IFN γ PARA O
DESENVOLVIMENTO E ATIVAÇÃO DO SISTEMA NADPH
OXIDASE HUMANO**

Campinas

UNICAMP

2008

CAROLINA CARDOSO DE MELLO PRANDO

**O PAPEL CRUCIAL DO EIXO IL12/23-IFN γ PARA O
DESENVOLVIMENTO E ATIVAÇÃO DO SISTEMA NADPH
OXIDASE HUMANO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

Campinas

UNICAMP

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P885p	Prando, Carolina Cardoso de Mello O papel crucial do eixo IL12/23-IFNγ para o desenvolvimento e ativação do sistema NADPH oxidase humano / Carolina Cardoso de Mello Prando. Campinas, SP : [s.n.], 2008. Orientador : Antonio Condino Neto Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. NADPH oxidase - Análise. 2. Micobacterioses. 3. Interferon gama. I. Condino Neto, Antonio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês :The crucial role of IL12/23-IFN γ axis for development and activation of human NADPH oxidase system

Keywords: • NADPH oxidase
• Mycobacterium Infections
• Interferon gamma

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto
Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco
Prof. Dr. José Vassalo
Profa. Dra. Virginia Paes Leme Ferriani
Profa. Dra. Maria Isabel Moraes Pinto

Data da defesa: 27 - 02 - 2008



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Membros:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Antonio Condino Neto

Profa. Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto

Maria Isabel de Moraes Pinto

Profa. Dra. Virginia Paes Leme Ferriani

Virginia Paes Leme Ferriani

Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva

Marcos Tadeu Nolasco da Silva

Prof. Dr. José Vassallo

José Vassallo

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/02/2008

**Este trabalho recebeu financiamento da Fundação
de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP)**

Processo No. 01/24365-3

DEDICATÓRIA

***Aos meus pais, Artemio e Iolanda, e
meus irmãos, Felipe e Camila, pelo
amor, pelo cuidado, pelo apoio em
todos os momentos da minha vida.***

Ao meu orientador, Dr Antonio Condino Neto, pela confiança no meu trabalho, por seu incentivo e compreensão.

À minha família, que compreendeu tantos momentos distantes e sempre me apoiou.

Ao Edgar, Márcia, Julia, Thaís, Angélica, Walmir e Patrícia, pela ajuda nas padronizações de muitos experimentos, pela amizade e oportunidade de trabalhar com vocês.

À Ana Carolina, com quem dividi as angústias e expectativas no projeto inicial de Doutorado.

Ao apoio da Bióloga do Laboratório de Biologia Molecular, Jussara, e dos alunos Marília, Juliana, Mateo, Marcos e Josias.

Ao incentivo das amigas de laboratório, docência e consultório, Mônica e Livia.

Ao Dr José Espin Neto, diretor da Faculdade de Medicina da PUC-Campinas, e aos professores Márcia, Silvia, Cesar e Juan, por compreenderem minhas ausências para participação de eventos científicos e sempre colaborarem com as muitas trocas de horário.

Aos Drs Jean-Laurent Casanova e Jean Laurent Abel pela confiança e oportunidade de conhecer e participar do seu trabalho.

À Dra Jacinta Cecília Bustamante, que contribuiu com discussões dos resultados deste trabalho.

Ao Dr Nelson Rosário, pela oportunidade do contato inicial com a Imunologia.

Ao secretário da pós-graduação em Farmacologia, Wanderlei.

À secretária da pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Simone.

Aos médicos que encaminharam pacientes para o estudo e se dedicam aos cuidados de cada paciente em suas cidades.

Aos pacientes e suas famílias, que permitiram este estudo.

Aos amigos verdadeiros!

RESUMO	<i>xvii</i>
ABSTRACT	<i>xix</i>
1. INTRODUÇÃO	21
2. JUSTIFICATIVA	38
3. HIPÓTESE	40
4. OBJETIVOS	42
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
6. RESULTADOS	53
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÃO	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO 1	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AD	Herança autossômica dominante
AR	Herança autossômica recessiva
AR	Herança autossômica recessiva
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BRAGID	Grupo Brasileiro de Estudo em Imunodeficiências
CD	"Cluster of differentiation"
cit <i>b</i>₅₅₈	Citocromo <i>b</i> ₅₅₈
CXCL8	Quimiocina CXC 8
CYBA	Gene da subunidade a do citocromo b
CYBB	Gene da subunidade b do citocromo b
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DHR	Dihidrorodamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	N-2-Hidroetilpiperazina-N-2-Etano Ácido Sulfônico

HHBSS	Solução Salina equilibrada (com HEPES) de Hank
HOCI	Ácido hipocloroso
IFNγ	Interferon-gama
IFNGR1	Receptor 1 do interferon gama
IFNGR1	Receptor 1 do Interferon-gama
IFNGR2	Receptor 2 do interferon gama
IFNGR2	Receptor 2 do Interferon-gama
IL-12	Interleucina 12
IL12p40	Subunidade p40 da Interleucina 12
IL12RB1	Receptor β 1 da Interleucina 12
IL-12Rβ1	Subunidade beta 1 do receptor da interleucina 12
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IRF	Fator de regulador do interferon
ISRE	Elemento de resposta estimuladora do interferon gama
LAD	Deficiência de molécula de adesão
MSMD	<i>Mendelian susceptibility to mycobacterial disease</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NBT	"Nitroblue tetrazolium"

NCF-1	Fator citosólico de neutrófilos 1
NCF-2	Fator citosólico de neutrófilos 2
NCF-4	Fator citosólico de neutrófilos 4
NEMO	Modulador essencial do NF- κ B
NF-κB	Fator nuclear kapa B
NK	Células <i>natural killer</i>
NK	"Natural killer"
PAGID	Grupo Pan-Americano de Estudo em Imunodeficiências
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	"Polimerase chain reaction"
<i>phox</i>	" Phagocyte oxidase "
PMA	Forbol miristato acetato
SMZ+TMP	Sulfametoxazol+trimetoprim
SOD	Superóxido dismutase
STAT1	Transdutor de sinais e ativador de transcrição 1
TH1	Linfócito T helper 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
X-DGC	DGC com herança ligada ao X
XL	Herança ligada ao X

LISTA DE TABELAS

PAG.

Tabela 1:	Principais citocinas secretadas por macrófagos em resposta a um estímulo bacteriano.....	22
Tabela 2:	Classificação atual das imunodeficiências primárias fagocitárias.....	23
Tabela 3:	Proposta de profilaxia e de tratamento de infecções e granulomas inflamatórios obstrutivos na Doença Granulomatosa Crônica.....	32
Tabela 4:	Variante alélicas dos defeitos do eixo IL12/23-IFN γ	35
Tabela 5:	Pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ avaliados neste estudo.....	50
Tabela 6:	Pacientes X91 ⁰ DGC utilizados para comparação com controles normais e pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ	51
Tabela 7:	Condições de estímulos para dosagem de anion superóxido em células B-EBV de controles normais, X91 ⁰ DGC e pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ	51
Tabela 8:	Agentes infecciosos como causa de infecções nos pacientes DGC e nao-DGC.....	58

PAG.

Figura 1:	Sistema NADPH oxidase.....	25
Figura 2:	Região promotora do gene <i>CYBB</i>	28
Figura 3:	Figura ilustrativa do eixo IL12/23-IFN γ	34
Figura 4:	Infecções apresentadas com maior frequência no grupo de pacientes DGC (n=54) e no grupo em que não se confirmou o diagnostico de DGC (n=50).....	55
Figura 5:	Historia familiar de infecções de repetição.....	56
Figura 6:	Reação adversa à vacina BCG.....	56
Figura 7:	Liberação de anion superóxido pelas células B-EBV de X91 ⁰ DGC e controles normais.....	61
Figura 8:	Liberação de anion superóxido pelas células B-EBV de pacientes com defeito no receptor 2 de IFN γ , X91 ⁰ DGC e controles normais.....	61
Figura 9:	Liberação de anion superóxido pelas células B-EBV de pacientes com defeito no receptor 1 de IFN γ , X91 ⁰ DGC e controles normais.....	62
Figura 10:	Liberação de anion superóxido pelas células B-EBV de pacientes com defeito na cadeia β 1 do receptor de IL12, X91 ⁰ DGC e controles normais.....	62

Figura 11: Expressão relativa do gene *CYBB* por PCR em tempo real em células B-EBV de pacientes X91⁰DGC e controles normais..... 64

Figura 12: Expressão relativa do gene *CYBB* por PCR em tempo real em células B-EBV de pacientes com defeito no receptor 2 de IFN γ , pacientes com defeito no receptor 1 de IFN γ , pacientes com defeito na cadeia β 1 do receptor de IL12, X91⁰DGC e controles normais..... 65

Resumo

O sistema NADPH oxidase fagocítico humano possui um papel importante na defesa contra microorganismos intracelulares, incluindo micobactérias. Mutações nas subunidades deste sistema resultam na Doença Granulomatosa Crônica (DGC). O gene *CYBB*, localizado no cromossomo X, codifica a subunidade gp91phox, e mutações neste gene são responsáveis por cerca de 60% dos casos de DGC. Cerca de 40 anos depois da identificação de DGC, foi identificado o primeiro dos 13 defeitos genéticos associados à Suscetibilidade Mendeliana à Micobacteriose, participantes do eixo IL12/23-IFN- γ . Baseado no fato de que ambas as doenças predis põem a infecções por micobactérias e que o IFN- γ é um importante ativador do gene *CYBB* os autores se propuseram a estudar as características clínicas de pacientes latino-americanos com DGC e o sistema NADPH oxidase e expressão do gene *CYBB* em pacientes com defeitos no eixo IL-12/23-IFN- γ . Em relação às características clínicas: história familiar de infecções graves e/ou de repetição, bem como reação adversa à vacina BCG, linfadenopatia, abscessos de pele e profundos estavam associados à DGC, em comparação com não-DGC avaliados pelo laboratório. Defeitos nos receptores IFNGR1 e IFNGR2 e cadeia B1 do receptor de IL-12 podem apresentar expressão do gene *CYBB* e atividade do sistema NADPH oxidase diminuída ou abolida, chegando a níveis comparáveis a um paciente com DGC. O IFN- γ e seus receptores são essenciais para o desenvolvimento e ativação do sistema NADPH oxidase, e pacientes com comprometimento da função deste sistema devem também ser avaliados para defeitos do eixo IL12/23-IFN- γ afetando secundariamente o sistema NADPH oxidase.

Abstract

The NADPH phagocytic oxidase system plays a crucial role in host defense against intracellular microorganisms, including mycobacteria. Mutations affecting subunits of this system result in Chronic Granulomatous Disease (CGD). The *CYBB* gene, located in the X chromosome, encodes gp91phox, and mutations on this gene account for more than 60% of CGD cases. Almost 40 years after, the first of 13 different genetic disorders associated with Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD), was identified. The genes responsible for MSMD are part of the IL12/23-IFN- γ axis. Based on the fact that both the diseases predispose to mycobacterial infections and that IFN- γ is an important activator of *CYBB* gene, the authors aimed to describe clinical aspects of Latin American CGD patients and investigate if the NADPH oxidase system function and gp91phox expression would be affected in patients with defects in the IL-12/23-IFN- γ axis. Regarding clinical features familial history of recurrent and severe infections, as well as adverse reactions to BCG vaccine, lymphadenopathy, skin and profound abscess were associated to DGC when compared to clinical features of non-CGD evaluated in the laboratory. Defects of IFNGR1 and IFNGR2 and IL12RB1 may present diminished or abolished gene expression of *CYBB* and activity of NADPH oxidase system at levels of a CGD patient. Based on that, we can conclude that IFN- γ and its receptor are essential for development and activation of NADPH oxidase system. In addition, patients who present an impaired superoxide release and/or failure on expressing gp91phox should also be evaluated for IL12/23-IFN- γ axis affecting secondarily the NADPH oxidase system.

1. Introdução

Os fagócitos, células do sistema imune inato, são elementos fundamentais na primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos patogênicos (Burg and Pillinger, 2001).

As células do sistema fagocítico são da linhagem mielomonocítica e têm capacidade de reconhecimento, ingestão e lise de microrganismos. Além disso, por meio dos produtos do burst respiratório, importantes para a morte de microrganismos fagocitados junto com as enzimas lisossomais, estas células também estão relacionadas à lesão tecidual associada a reações inflamatórias, regulação de outras células da resposta imune e moléculas de sinalização intracelular, como as envolvidas no processo de apoptose (Karlsson and Dahlgren, 2002).

Os fagócitos exercem função imunomoduladora no sistema imune, promovendo inclusive ativação de células do sistema imune adaptativo, através da liberação de citocinas. As principais citocinas liberadas células fagocíticas são a interleucina 1β (IL- 1β), o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a IL-6, a IL-8 (também denominada CXCL8) e a IL-12 (Tabela 1) (Cheng and Kunkel, 2003; Fialkow et al., 1997; Kobayashi, 2008).

Tabela 1: Principais citocinas secretadas por macrófagos em resposta a um estímulo bacteriano

Citocina	Função
IL- 1β	Ativação do endotélio vascular e linfócitos; destruição tecidual local e aumento do acesso das células efetoras ao local da inflamação.
TNF- α	Ativação e aumento da permeabilidade vascular, que leva a um aumento da passagem de IgG, complemento e células para os tecidos e aumento da drenagem de líquidos para os linfonodos.
IL-6	Ativação de linfócitos; aumento da produção de anticorpos.
CXCL8	Fator quimiotático que recruta neutrófilos, basófilos e células T para o local da infecção.
IL-12	Ativação de células NK; indução da diferenciação de células T CD4 em células T_H1 .

Adaptado de Janeway (Janeway)

Defeitos em número, mecanismos efetores ou funções imunomoduladoras de fagócitos resultam em diversas imunodeficiências primárias, com quadro clínico variável, porém geralmente grave, conforme classificação abaixo (Tabela 2) (Geha et al., 2007).

Tabela 2: Classificação atual das imunodeficiências primárias fagocitárias.

	Doença	Células afetadas	Função afetada	Características associadas	Herança	Defeito genético
1.-3.	Neutropenias congênicas graves	N	Diferenciação celular	Mielodisplasia	AD	<i>ELA2</i>
		N	Diferenciação celular	Linfopenia B/T	AD	<i>GF11</i>
		N	Diferenciação celular	Neutropenia refratária ao G-CSF	AD	G-CSFR
4.	Doença Kostmann	N	Diferenciação celular		AR	HAX1
5.	Neutropenia Cíclica	N	?	Oscilação de outros leucócitos e plaquetas	AD	<i>ELA2</i>
6.	Neutropenia ligada ao X/ Mielodisplasia	N+M	?	Monocitopenia	XL	<i>WASP</i>
7.	Deficiência de P14	N+M Melanócitos	Biogênese dos endossomas	Neutropenia	AR	<i>MAPBP1P</i>
8.	LAD tipo I	N+M L+NK	Adesão, quimiotaxia, endocitose, citotoxicidade T/NK	Atraso na queda do coto umbilical, úlceras de pele, periodontite, leucocitose	AR	<i>ITGB2</i>
9.	LAD tipo II	N+M	Rolamento, quimiotaxia	LAD-I, grupo sanguíneo hh e retardo mental	AR	FUCT1 GDP
10.	LAD tipo III	L+NK	Adesão	LAD-I, tendência a sangramento	AR	Defeito da ativação de Rap1 mediada por integrinas $\beta 1-3$
11.	Deficiência de Rac 2	N	Adesão, quimiotaxia, produção de O_2^-	Alteração da cicatrização, leucocitose	AD	<i>RAC2</i>
12.	Deficiência de β -actina	N+M	Mobilidade celular	Retardo mental, baixa estatura	AD	<i>ACTB</i>
13.	Periodontite juvenil localizada	N	Quimiotaxia induzida por formilpeptídeo	Apenas periodontite	AR	<i>FPR1</i>
14.	Síndrome de	N+M	Quimiotaxia	Periodontite,	AR	<i>CTSC</i>

	Papillon-Lefèvre			hiperqueratose palmo-plantar		
15.	Deficiência de grânulos específicos	N	Quimiotaxia	Neutrófilos com núcleo bilobulado	AR	<i>C/EBPE</i>
16.	Síndrome de Shwachman-Diamond	N	Quimiotaxia	Pancitopenia, insuficiência pancreática exógena, condrodisplasia	AR	<i>SBDS</i>
17.	DGC ligada ao X	N+M	Morte do patógeno (relacionada à produção de O ₂)	Grupo sanguíneo fenótipo McLeod	XL	<i>CYBB</i>
18. - 20.	DGC autossômica recessiva	N+M	Morte do patógeno (relacionada à produção de O ₂)		AR	<i>CYBA</i> <i>NCF1</i> <i>NCF2</i>
21.	Deficiência neutrofílica de G6PD	N+M	Morte do patógeno (relacionada à produção de O ₂)	Anemia Hemolítica	XL	<i>G-6PD</i>
22.	Deficiência da cadeia β1 dos receptores de IL-12 e IL-23	L+NK	Produção de IFN-γ		AR	<i>IL-12Rβ1</i>
23.	Deficiência de IL-12p40	M	Produção de IFN-γ		AR	<i>IL-12p40</i>
24.	Deficiência do receptor de IFN-γ	M+L	Ligação do IFN-γ e posterior sinalização		AR, AD	<i>IFNGR1</i>
25.	Deficiência do receptor 2 do IFN-γ	M+L	Ligação do IFN-γ e posterior sinalização		AR	<i>IFNGR2</i>
26.	Deficiência de STAT-1 (2 formas)	M+L	Sinalização de IFN α/β/γ		AR	<i>STAT1</i>
			Sinalização de IFN-γ		AD	

(N) neutrófilos; (M) monócitos; (L) linfócitos; (NK) *natural killer*; (IFN) interferon; (LAD) Defeito de Molécula de Adesão; (DGC) Doença Granulomatosa Crônica; (G6PD) glicose-6-fosfato-desidrogenase; (AR) autossômica recessiva; (AD) autossômica dominante; (XL) ligada ao X.

Nesta tese investigamos aspectos específicos de dois grupos de doenças: a Doença Granulomatosa Crônica e os Defeitos do Eixo IL12/23-IFNγ.

1.1. Doença Granulomatosa Crônica

A Doença Granulomatosa Crônica é caracterizada por defeito microbicida congênito secundário à falha na produção de reativos intermediários do oxigênio (Berendes, 1957; Bridges, 1959; Quie et al., 1967).

O sistema que produz os reativos intermediários do oxigênio é denominado nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). Este sistema é composto pelas seguintes subunidades: p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox*, que são encontrados na forma de um complexo no citosol de neutrófilos não ativados; rac2, uma proteína citosólica tipo ras; p22-*phox* e gp91-*phox*, que são componentes da membrana e se associam formando o citocromo b_{558} (cit b_{558}) (Burg and Pillinger, 2001) (Figura 1).

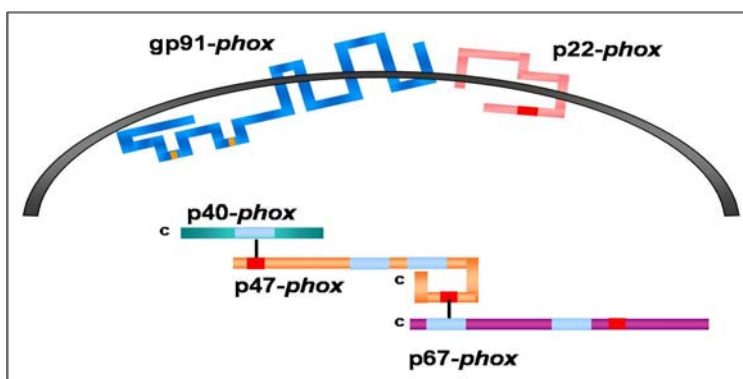


Figura 1: Sistema NADPH oxidase. As 2 subunidades de membrana, gp91-*phox* e p22-*phox*, formam o citocromo b_{558} . No citosol, após estímulo para ativação do sistema, as proteínas p40-*phox*, p47-*phox* e p67-*phox* formam um complexo que sofrem alterações conformacionais e translocam-se até a membrana, ligando-se ao citocromo b_{558} . É no interior da gp91-*phox* que ocorre a transferência de elétrons para o oxigênio molecular.

Este sistema tem como função a produção de compostos reativos do oxigênio, a partir da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio (O_2) no interior da subunidade gp91-*phox* (Klebanoff, 1993; Klebanoff and Nathan, 1993; Pacelli et al., 1995).

O gene *CYBB* codifica a glicoproteína gp91-*phox* é componente fundamental para o sistema NADPH oxidase, uma vez que é no seu interior que ocorre a transferência de elétrons para o oxigênio molecular e se inicia o processo de formação dos reativos intermediários do oxigênio (Segal, 1996; Shatwell and Segal, 1996).

O superóxido, um oxidante microbicida relativamente fraco, é metabolizado em um produto mais tóxico, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 , por sua vez, é convertido em ácido hipocloroso (HOCl) e ânion hidroxila pela mieloperoxidase (Leusen et al., 1996).

Os neutrófilos ativados também convertem ânion nitrito (NO_2^-) nos oxidantes pró-inflamatórios nitril clorídrico (NO_2Cl) e $\cdot NO_2$ por uma via mieloperoxidase-dependente. A óxido nítrico sintase induzível e a mieloperoxidase localizam-se nos grânulos primários dos neutrófilos, sugerindo que os produtos destas vias - NO_2Cl , $\cdot NO_2$ e O_2^- - misturam-se no vacúolo fagocítico, formando novas vias de defesa (Eiserich et al., 1998; Evans et al., 1996).

O sistema NADPH oxidase pode ser induzido por diversas citocinas, particularmente $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ em monócitos e granulócitos (Cassatella et al., 1990; Condino-Neto et al., 1998; Schapiro et al., 1991). O efeito do $IFN\gamma$ no sistema NADPH oxidase é bastante evidente em resultados de estudos que demonstram que o estímulo com esta citocina promove aumento na expressão de gp91-*phox* em fagócitos de pacientes com forma variante de Doença Granulomatosa Crônica (DGC) devido à mutação no gene *CYBB* (Ezekowitz et al., 1987), bem como melhora do processo de *splicing* e conseqüente

aumento da estabilidade de transcritos deste gene em fagócitos de pacientes com DGC (Condino-Neto and Newburger, 2000; Ishibashi et al., 2001).

A região proximal do promotor (-450 to +12 bp) do gene *CYBB* é suficiente para prover sua regulação transcricional pelo IFN- γ (Figura 2). Este elemento do promotor contém sítios de ligação para importantes repressores e ativadores de transcrição. Múltiplos sítios de ligação para o repressor CCAAT *displacement protein* (CDP) medeiam a restrição da expressão do gene *CYBB* em células mielóides maduras (Catt et al., 1999; Luo and Skalnik, 1996; Skalnik, 2002), em cooperação com a proteína *matrix attachment region-binding protein* STAB1 (Hawkins et al., 2001). Um dos sítios de reconhecimento do CDP também liga a proteína repressora *homeobox protein* HoxA10 (Lu et al., 2003), a qual desacopla deste complexo após fosforilação em tirosina do componente HoxA10 durante a indução da diferenciação da linhagem U937 com IFN- γ permitindo sua liberação e reposição pelo ativador transcricional HoxA9 (Bei et al., 2005).

Mutação nos genes que codificam as subunidades p47-*phox*, p67-*phox* p22-*phox* e gp91-*phox* resultam na falha de produção de compostos reativos do oxigênio, com conseqüente falha no processo de lise do patógeno intracelular e predisposição a infecções, caracterizando a Doença Granulomatosa Crônica (DGC) (Berendes et al., 1957; Bridges et al., 1959; Quie et al., 1967).

A DGC caracteriza-se clinicamente como imunodeficiência grave e rara, com incidência estimada entre 1/200.000 e 1/250.000 nascidos vivos por ano (Winkelstein et al., 2000). Os quadros infecciosos por bactérias catalase positivas como *Staphylococcus aureus* e bacilos gram-negativos, micobactérias e fungos como *Aspergillus*, *Candida* e *Nocardia*, ocorrem predominantemente em locais considerados barreiras naturais do organismo (Forrest et al., 1988; Segal et al., 2000).

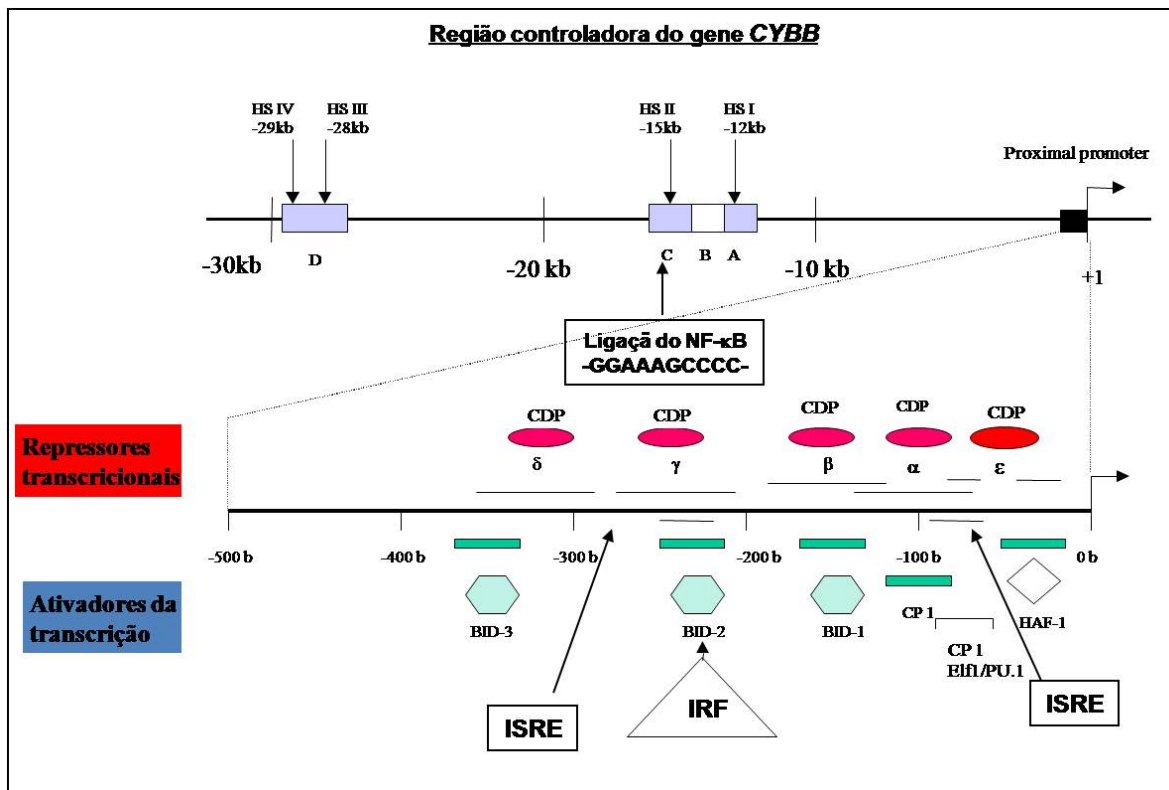


Figura 2: Região promotora do gene *CYBB*. Observe os locais de atuação do IFN γ através do fator regulador do interferon (IRF) e dos elementos de resposta estimuladora do IFN γ (ISRE) na região promotora proximal do gene *CYBB*. Na região entre -10 e -20kb está o local de ligação do NF- κ B.

Linfonodos que drenam áreas de barreira, bem como infecções acometendo fígado, pâncreas, ossos e sistema nervoso central também são acometidos por processos infecciosos (Forrest et al., 1988).

Granulomas decorrentes da atividade inflamatória persistente provocam quadros de obstrução em vísceras ocas, tais como órgãos do trato gastrointestinal e urinário (Bridges et al., 1959; Landing and Shirkey, 1957; Segal, 1988). A patogenia do processo

que leva à formação dos granulomas ainda não esta esclarecida, podendo ser resultado da persistência da resposta inflamatória devido à falha na ativação de fatores quimiotáticos pelo sistema mieloperoxidase (Ohno et al., 1986) ou à falha no clareamento de material antigênico dos locais onde ocorreram infecções (Chin et al., 1987).

Cerca de 60% dos casos de DGC correspondem à forma ligada ao X, por mutação no gene *CYBB*, o qual codifica a glicoproteína gp91-*phox* (Dinauer et al., 1987; Winkelstein et al., 2000). Nas formas autossômicas recessivas é afetado um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, respectivamente a p47-*phox* ou p67-*phox* (respectivamente 33% e 5% dos casos) (Clark et al., 1990; Winkelstein et al., 2000); ou ainda a cadeia leve do citocromo *b*₅₅₈, o componente p22-*phox* (6% dos casos) (Dinauer et al., 1987; Dinauer et al., 1990; Parkos et al., 1988; Winkelstein et al., 2000).

A classificação atual de DGC considera os defeitos moleculares específicos, sendo codificada por “A” para autossômica ou “X” para ligada ao sexo; o componente defeituoso da oxidase é representado pelo peso molecular da proteína afetada, “91,” “22,” “47,” ou “67”; e a expressão da proteína daquele componente é indicada pelo sobrescrito “0” para ausente, “+” para presente, e “-” para reduzida. Na maioria dos casos de X-DGC, a gp91-*phox* não é detectada por imunoblot, o que é referido como X91⁰DGC. Em alguns casos, a gp91-*phox* e atividade oxidativa residual estão presentes (X91⁻DGC), e em número reduzido de casos há quantidades normais da proteína, que no entanto não é funcional (X91⁺DGC) (Lew et al., 1981; Newburger et al., 1986; Rae et al., 1998; Roos et al., 1996). A maioria das formas autossômicas recessivas de DGC não guardam expressão residual do componente afetado (fenótipos A22⁰, A47⁰, e A67⁰), entretanto formas variantes autossômicas ocasionais de DGC já foram descritas (Dinauer et al., 1991; Leusen et al., 1996; Shurin et al., 1983).

A maioria dos pacientes com DGC apresenta infecções graves e precoces durante o primeiro ano de vida, com diferenças em relação ao padrão genético da doença, uma vez que pacientes com a forma autossômica recessiva ou outras formas “variantes” tendem a apresentar quadro clínico menos grave, com início tardio dos sintomas (Agudelo-Florez et al., 2006b; Liese et al., 1996; Prando-Andrade et al., 2004; Weening et al., 1985; Winkelstein et al., 2000).

O diagnóstico tem como base os aspectos clínicos da DGC, a comprovação laboratorial da falha na produção de reativos intermediários do oxigênio e posterior identificação da mutação no gene *CYBB*, *CYBA*, *NCF1* ou *NCF2*.

A atividade do sistema NADPH oxidase pode ser avaliada através do teste do NBT (nitroblue-tetrazolium) ou por citometria de fluxo com o uso da DHR (dihidrorodamina) (Ochs and Igo, 1973; Repine et al., 1978; Repine et al., 1979; Roesler et al., 1991; Woodman et al., 1995). Outros testes diagnósticos de medidas quantitativas, como a liberação de superóxido, o consumo de oxigênio ou a produção de peróxido de hidrogênio podem ser utilizados, entretanto estes três métodos avaliam a atividade NADPH oxidase global das células, não sendo apropriados para a detecção de portadoras sãs do gene da DGC ligada ao sexo (Hasui et al., 1991).

Na década de 70, 50 a 75% dos pacientes com DGC morriam antes dos 7 anos de idade, porém, atualmente, os tratamentos disponíveis reduziram muito as mortes por complicações infecciosas. A maioria das mortes por DGC ocorrem durante as duas primeiras décadas da vida, sendo a sobrevida atual de 50% aos 20 anos (Finn et al., 1990; Winkelstein et al., 2000).

Os cuidados profiláticos para os pacientes com DGC incluem a prevenção das infecções por meio de imunizações e remoção das fontes de patógenos; o uso de antibiótico profilático e o uso de interferon-gama humano recombinante. (Roos and Curnutte, 1999).

Todos os pacientes devem receber as imunizações de rotina (incluindo as vacinas de vírus vivos atenuados), bem como a vacina anual contra influenza. Vacinas contendo bactérias vivas atenuadas, como a BCG, são contra-indicadas devido ao risco de reações adversas graves em imunodeficientes (Casanova et al., 1996; Grumach et al., 1997; Pasic et al., 1998; Talbot et al., 1997; Yeganeh et al., 2007)

O transplante de células tronco hematopoiéticas é a única alternativa de cura para a DGC até o momento e deve ser considerado precocemente, quando há maior tolerância ao transplante e ainda são poucas as seqüelas dos processos infecciosos (Seger, 2008).

A administração regular de sulfametoxazol+trimetoprim (SMZ+TMP) e itraconazol tem sido recomendada para a prevenção de infecções bacterianas e fúngicas respectivamente. E frente a um processo infeccioso, o tratamento deve ser iniciado precocemente e mantido por um tempo prolongado para garantir a erradicação do patógeno. Atualmente, é sugerido esquema de profilaxia e tratamento conforme a tabela 3, adaptada de revisão publicada por Seger, 2008 (Seger, 2008).

Em nosso serviço profilaxia de infecções fúngicas e bacterianas é feita da mesma maneira que proposto por Seger [Seger, 2008]. Para o tratamento de infecções bacterianas o início do tratamento em geral é feito com SMZ+TMP intravenoso ou Vancomicina para cobertura de Gram positivos e Ciprofloxacina ou Aminoglicosídeos para Gram negativos. Anfotericina B é utilizada inicialmente para o tratamento das infecções

fúngicas. Após identificada a bactéria ou o fungo responsável pelo processo infeccioso o antibiótico ou antifúngico podem ser substituídos por drogas específicas.

Tabela 3: Proposta de profilaxia e de tratamento de infecções e granulomas inflamatórios obstrutivos na Doença Granulomatosa Crônica

Modalidade	Indicação	Duração	Fármaco	Posologia
Antibiótico profilaxia	Infecções bacterianas	Toda a vida	SMZ+TMP	6+30 mg/kg/dia
	Infecções fúngicas	Toda a vida	Itraconazol	5 mg/kg/dia
Tratamento antibiótico empírico	Infecções por Gram+	Até identificação do patógeno	Teicoplanina	10 mg/kg/dia
	Infecções por Gram-	Até identificação do patógeno	Ciprofloxacina	15 mg/kg/dia
	Infecções fúngicas	Até identificação do patógeno	Voriconazol	14 mg/kg/dia
Profilaxia com IFNγ	Infecções recorrentes	Toda a vida	IFN γ humano recombinante	50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ /semana (3x/semana)
Tratamento antiinflamatório	Granulomas obstrutivos	7 a 10 dias, seguido de redução gradual da dose	Prednisolona	0,5 a 1 mg/kg/dia

Baseado na sua capacidade de modulação da atividade do sistema NADPH oxidase o IFN γ está indicado para pacientes com DGC na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de superfície corporal, por via subcutânea, três vezes por semana. O uso de IFN γ humano recombinante reduz o risco relativo de infecções graves em 70%, não tendo sido observados efeitos adversos graves em estudo de fase III (1991).

O mecanismo de ação do IFN γ em relação à prevenção de infecções nos pacientes com DGC ainda não está totalmente esclarecido, porém ele age particularmente

bem nas formas variantes e autossômicas recessivas de DGC. Um subgrupo específico de pacientes com forma variante de DGC ligada ao X, que apresenta mutações nos locais de *splice*, mostrou-se responsivo ao IFN γ (Bemiller et al., 1995; Condino-Neto et al., 1993; Ezekowitz et al., 1987; Forrest et al., 1988; Patino et al., 1999; Weening et al., 1995), com aumento da eficiência dos *splicing*, produzindo transcritos normais de gp91-*phox* (Condino-Neto and Newburger, 2000).

Atualmente, a profilaxia com IFN γ tem sido utilizada amplamente nos Estados Unidos da América, em função da redução do risco relativo de infecções graves em 70% (Ezekowitz, 1999). Na Europa entretanto, é utilizado em casos selecionados, sendo esta opção justificada pelo fato de que nos estudos realizados até o momento, não se observou redução significativa de infecção pelo *Aspergillus* e não há demonstração de benefício para o paciente “saudável” *versus* “cronicamente doente” (Seger, 2008). Em nosso laboratório, investigamos atualmente o efeito do IFN γ num grupo de pacientes com defeitos de *splicing* do gene *CYBB*, sendo esses casos aparentemente os que mais se beneficiam desta citocina.

1.2. Defeitos do eixo IL12/23-IFN γ

Como citado anteriormente, a IL-12 secretada por macrófagos é uma citocina com capacidade de induzir a diferenciação das células T CD4 em células com padrão de liberação de citocinas T_H1. A principal função efetora das células T_H1 consiste na ativação de macrófagos infectados ou que tenham fagocitado patógenos através da liberação de IFN γ e da expressão do CD40 ligante (Figura 3)

Os defeitos do eixo interleucina 12/23- interferon gama (IL12/23-IFN γ) foram inicialmente denominados Síndrome de Suscetibilidade Mendeliana à Micobacteriose (MSMD), e o primeiro defeito genético relacionado à MSMD foi identificado em 1996, em

duas famílias com mutação recessiva nula no gene *IFNGR1*, que codifica a cadeia 1 do receptor de IFN γ (Jouanguy et al., 1996; Newport et al., 1996).

Atualmente cerca de 220 pacientes foram diagnosticados com defeito no eixo IL12/23-IFN γ e foram identificados outros 4 genes autossômicos (*IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1*) e um gene localizado no cromossomo X (*NEMO*) (Figura 3). A subunidade p40, codificada pelo gene *IL12*, é utilizada também para a formação da IL23 (Filipe-Santos et al., 2006a).

Devido a variantes alélicas, estes 6 genes respondem por 13 etiologias genéticas distintas (Tabela 4) (Filipe-Santos et al., 2006a).

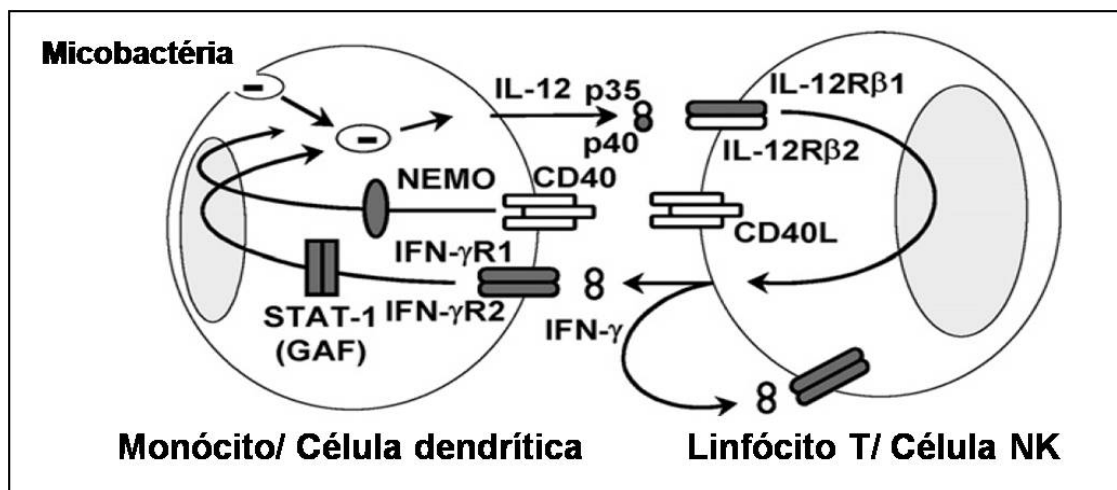


Figura 3: Figura ilustrativa do eixo IL12/23-IFN γ . Representação esquemática da produção de citocinas e cooperação entre monócitos/células dendríticas e linfócitos T/células NK. A produção de IL12 é controlada tanto pelo IFN γ quanto pela sinalização CD40-NEMO. Em cinza estão as moléculas relacionadas aos defeitos do eixo IL12/23-IFN γ . Adaptado de Filipe-Santos et al, 2006.

Com o aumento da casuística e dos genes identificados, observou-se pacientes com MSMD também suscetíveis a infecções por outros microrganismos, embora mantendo

sempre a condição de infecção por micobactérias associada. *Salmonella sp.*, está presente em metade dos pacientes com defeitos nos genes *IL12B* e *IL12RB1* (Altare et al., 1998; MacLennan et al., 2004; Picard et al., 2002). *Nocardia* e *Paracoccidioidomyces* também já foram isolados em pacientes com MSMD, porém trata-se de relatos de caso isolados, não sendo possível estabelecer conclusões definitivas sobre sua relação com MSMD (Moraes-Vasconcelos et al., 2005; Picard et al., 2002). Em virtude da diversificação de patógenos aos quais os pacientes com MSMD são suscetíveis, considerou-se adequado renomear tal entidade como “Defeitos do eixo IL12/23-IFN γ ” (Filipe-Santos et al., 2006a).

Tabela 4: Variantes alélicas dos defeitos do eixo IL12/23-IFN γ .

Gene	Herança	Tipo de Defeito	Expressão Prot.
IFN-γR1	AR	C	E+
	AR	C	E-
	AD	P	E+
	AR	P	E+
IFN-γR2	AR	C	E+
	AR	C	E-
	AR	P	E+
Stat-1	AD	P	E+P-
	AD	P	E+B-
IL-12B	AR	C	E-
IL-12Rβ1	AR	C	E+
	AR	C	E-
NEMO	XR	P	E+

(AD) autossômica dominante; (AR) autossômica recessiva; (XR) recessiva ligada ao X; (C) completo; (P) parcial; (E+) proteína expressa; (E-) proteína não-expressa; (P-) ausência de fosforilação; (B-) falha na ligação ao DNA

As 2 formas mais comuns de defeitos do eixo IL12/23-IFN γ são resultado de mutação nos genes *IL12RB1* (40%) e *IFNGR1* (39%) (Filipe-Santos et al., 2006a).

Os defeitos completos do receptor 1 de IFN γ são muito graves. Nos pacientes deste grupo, além de infecções por BCG e outras micobactérias não virulentas, 3 de 22 pacientes apresentaram salmonelose (Dorman et al., 2004). Nos defeitos parciais do receptor 1 do IFN γ , seja recessivo ou autossômico, devido à função residual do receptor 1 de IFN γ o quadro clínico costuma ser mais brando. Em pacientes com defeito parcial recessivo há relato de infecção por *M. tuberculosis* e nos casos de defeito parcial por herança autossômica dominante chama atenção a maior incidência de osteomielite por micobactérias (Allende et al., 2001; Arend et al., 2001; Jouanguy et al., 1997). O transplante de células tronco hematopoiéticas está indicado para a forma completa de defeito do receptor 1 de IFN γ . Antibioticoprofilaxia deve ser utilizada em todas as formas, e os pacientes com função residual do receptor podem se beneficiar da administração de IFN γ humano recombinante (Filipe-Santos et al., 2006a).

Os 9 pacientes com diagnóstico de defeito no receptor 2 de IFN γ até o momento apresentaram quadro clínico extremamente grave de infecções por micobactérias não virulentas e BCG. Para este grupo de pacientes é indicado o transplante de células tronco hematopoiéticas o mais precoce possível (Doffinger et al., 2000; Dorman and Holland, 1998; Vogt et al., 2005).

Os defeitos da subunidade p40 (IL12-B) e do receptor B1 de IL12 apresentam como particularidade a suscetibilidade a infecções por *Salmonella* em cerca de 50% dos casos descritos (Fieschi et al., 2003; MacLennan et al., 2004; Picard et al., 2002). Além disso, observa-se também infecção por *M. tuberculosis* não associada a outros patógenos em pacientes com defeito do receptor B1 de IL12. Nestes 2 grupos de defeitos genéticos o prognóstico dos pacientes é bom, e o tratamento consiste na administração de IFN γ humano recombinante.

Dois grupos bastante distintos são observados nos defeitos de STAT-1: pacientes heterozigotos, com suscetibilidade a infecções por micobactérias apenas e bom prognóstico (Chapgier et al., 2006a; Dupuis et al., 2001); e pacientes homozigotos, com comprometimento da produção tanto de IFN γ quanto de IFN α e IFN β e susceptibilidade também a infecções virais, particularmente encefalite pelo vírus herpes simples (Chapgier et al., 2006b; Dupuis et al., 2003).

Os defeitos de NEMO consistem também de fenótipos distintos: displasia anidrótica ectodérmica com imunodeficiência (EDA-ID), EDA-ID associada a osteopetrose e um terceiro grupo em que não se observam alterações morfológicas associadas à imunodeficiência primária (Doffinger et al., 2001; Filipe-Santos et al., 2006b; Jain et al., 2001; Zonana et al., 2000).

2. Justificativa

Estudos *in vitro* e em modelos animais, bem como a observação clínica do benefício do uso do IFN γ para o controle de infecções em pacientes com DGC, demonstram a importância desta citocina no desenvolvimento, regulação e ativação do sistema NADPH oxidase. Esta citocina possui local de ação bem definido na região promotora do gene *CYBB*, que codifica a glicoproteína gp91-*phox* do sistema NADPH oxidase.

Pacientes com defeitos congênitos das subunidades do sistema NADPH oxidase – DGC - e pacientes com defeito na produção e receptores das citocinas IL-12 e IFN γ - defeitos do eixo IL12/23-IFN γ – possuem em comum a suscetibilidade a infecções por micobactérias

Não existem dados na literatura sobre as consequências dos defeitos do eixo IL12/23-IFN γ na atividade do sistema NADPH oxidase.

3. Hipótese

Defeitos no eixo IL12/23-IFN γ resultam em falha da ação do IFN γ na região promotora do gene *CYBB*, provocando um defeito funcional do sistema NADPH oxidase com fenótipo celular semelhante à DGC ?.

4. Objetivos

1.1. Caracterização clínica e comparação de dados clínicos de pacientes com suspeita de DGC encaminhados para avaliação no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

1.2. Comparar as características clínicas de pacientes com DGC e pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ . Avaliar a atividade do sistema NADPH oxidase em pacientes com defeitos nos receptores 1 e 2 do IFN γ (IFNGR1 e IFNGR2) e da cadeia β 1 do receptor de IL-12 (IL12RB1) e comparar com a atividade do mesmo sistema em controles normais e pacientes com X91⁰DGC.

1.3. Comparar as características clínicas de pacientes com DGC e pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ

1.4. Avaliar a atividade do sistema NADPH oxidase em pacientes com defeitos nos receptores 1 e 2 do IFN γ (IFNGR1 e IFNGR2) e da cadeia β 1 do receptor de IL-12 (IL12RB1) e comparar com a atividade do mesmo sistema em controles normais e pacientes com X91⁰DGC.

1.5. Avaliar a expressão do gene *CYBB* em pacientes com defeitos nos receptores 1 e 2 do IFN γ (IFNGR1 e IFNGR2) e da cadeia β 1 do receptor de IL-12 (IL12RB1) e comparar com a expressão do mesmo gene em controles normais pacientes com X91⁰DGC.

5. Casuística e Métodos

1.1. Casuísticas e Métodos diagnósticos

O estudo clínico seguiu o modelo de estudo observacional descritivo de uma série de casos, com componentes retrospectivos e prospectivos.

Os pacientes ingressaram no estudo após aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP.

1.1.1. Pacientes candidatos a Doença Granulomatosa Crônica

Foram avaliados 104 pacientes encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular- CIPED- UNICAMP, com suspeita de imunodeficiência primária fagocitária. Os pacientes ou dados clínicos foram encaminhados de diversos serviços médicos brasileiros (Departamento de Pediatria do Hospital de Clinicas da UNICAMP; Laboratorio de Investigación Médica LIM-56 da Faculdade de Medicina USP/SP; Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia do Departamento de Pediatria da Escola Paulista de Medicina; Departamento de Pneumologia Pediátrica do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro; Ambulatório de Pediatria de Belém; Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) bem como do México, Colômbia, Chile e Paraguai.

A avaliação clínica constou de anamnese e exame físico de pacientes com DGC ou revisão de dados de ficha padronizada (Anexo 1).

Após estudo bioquímico (teste do NBT e/ou ensaio de liberação de superóxido pelos leucócitos) os pacientes foram divididos em grupo DGC e grupo não-DGC.

Entre os 54 pacientes com diagnóstico de DGC, 14 já tiveram a mutação correspondente identificada (7 pacientes com mutação no gene *CYBB* e 7 pacientes com mutação no gene *NCF2*) (Agudelo-Florez et al., 2006a; Patino et al., 1999).

1.1.1.1. Coleta de sangue venoso periférico

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção de veia periférica, com material estéril e descartável. Foram coletados 5ml para a realização do teste do NBT e 10ml para a dosagem de ânion superóxido.

1.1.1.2. Obtenção de neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico

A preparação da suspensão de neutrófilos e células mononucleares como populações celulares puras a partir do sangue periférico foi realizada utilizando-se um “kit” com gradientes de densidade descontínuos (Sigma Histopaque 1.077 g/ml e 1.119 g/ml, St. Louis, E.U.A.) de acordo com as instruções do fabricante (English and Andersen, 1974).

Sumariamente, as amostras de sangue dos voluntários e pacientes, foram transferidas para outro tubo plástico contendo os gradientes de densidade descontínuos. A ordem dos reagentes dentro do tubo foi: Histopaque 1,119 g/ml (camada inferior), Histopaque 1,077 g/ml (camada intermediária), sangue (camada superior); respectivamente nas proporções de 25%, 25% e 50% (v/v/v). Esta mistura foi centrifugada a 700 x g durante 30 minutos em temperatura ambiente, resultando em 3 camadas compostas predominantemente de: células mononucleares (camada superior), neutrófilos (camada intermediária) e hemácias (camada inferior). As camadas contendo células mononucleares e neutrófilos foram cuidadosa e individualmente transferidas para tubos distintos,

ressuspendidas em meio de Hanks (pH 7,4) sem cálcio e magnésio, suplementado com N-2-hidroetilpiperazina-N-2-etano ácido sulfônico (HEPES) (10 mM, solução salina equilibrada de Hank- HHBSS) e lavadas três vezes consecutivas nesse meio. Eritrócitos contaminantes foram lisados hipotonicamente, quando necessário. A contagem dos leucócitos foi determinada automaticamente (contador Coulter, modelo T 890, Hialeah, Fla., E.U.A.), sendo sua concentração ajustada conforme a necessidade dos experimentos, em HHBSS (pH 7,4), contendo cloreto de cálcio (1mM). A pureza das populações de neutrófilos e de células mononucleares foi, em média, de 95%, com viabilidade superior a 90%, avaliada pelo azul de tripan

1.1.1.3. Teste do NBT

Este teste baseia-se na redução do corante NBT para complexos azulados, denominados complexos de formazan, no interior de leucócitos (Ochs and Igo, 1973). A ausência de redução do corante ou quantidade de células positivas abaixo de 5% é necessária para o diagnóstico de DGC (Conley et al., 1999). Pacientes com DGC “variante” podem apresentar positividade do teste acima de 95%, mas com uma quantidade muito menor de formazan no interior das células. O teste foi realizado com 5ml de sangue venoso colocados, imediatamente após a coleta, sobre lâmina de vidro previamente incubada a 37°C por 30 minutos. Para cada paciente foi montada uma lâmina para análise das células em repouso, sobre a qual foi adicionado o corante NBT (Sigma N-6876) e PBS a uma concentração de 1mg/ml acrescido de 1µl/ml de dimetilsulfóxido (DMSO), e outra lâmina em que as células foram estimuladas com acetato de forbol-miristato (PMA, 1 µg/ml, concentração final). Todos os ensaios foram

realizados simultaneamente com um controle sadio (Ochs and Igo, 1973; Patino et al., 1999).

1.1.1.4. Dosagem do ânion superóxido liberado por neutrófilos e células mononucleares

A quantificação do ânion superóxido liberado pelos neutrófilos e células mononucleares dos voluntários e pacientes foi realizada de acordo com procedimento previamente publicado e modificado por CONDINO-NETO (Condino-neto et al., 1996; Condino-Neto et al., 1993; McCord and Fridovich, 1969).

Resumidamente, as suspensões de neutrófilos e de células mononucleares numa concentração final de 2×10^6 céls./ml em HHBSS (pH 7,4, CaCl_2 1mM), obtidas como descrito no item anterior, foram incubadas com forbol-miristato-acetato (PMA, 30 nM), na presença de citocromo C (80 μM), durante 60 minutos a 37°C. A liberação espontânea de ânion superóxido foi avaliada usando-se HHBSS, ao invés de PMA. Metade dos tubos continha superóxido dismutase (SOD, 90 U/ml) no início do experimento, como controle da redução inespecífica do citocromo C. A reação foi interrompida, colocando-se todos os tubos em banho de gelo e adicionando-se SOD (90 U/ml) aos que não a continham. Após centrifugar os tubos a 2200 x g durante 15 minutos a 4°C, foi medida a absorbância de seus sobrenadantes a 550nm. A produção de ânion superóxido foi calculada usando-se um coeficiente de extinção de $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em nmols/ 10^6 células/hora. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

1.1.2. Pacientes com Defeito no Eixo IL12/23-IFN γ

Foram avaliados 8 pacientes previamente diagnosticados com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ , especificamente com alterações nos receptores 1 e 2 do IFN γ e na cadeia β 1 do receptor de IL-12 (Tabela 5).

Os testes diagnósticos (Feinberg et al., 2004) e a caracterização molecular (Filipe-Santos et al., 2006a) desses pacientes foram realizados no laboratório de Genética Humana das Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina Necker, Universidade de Paris René Descartes INSERM U550 e as células B imortalizadas com vírus EBV foram gentilmente cedidas para este estudo pelo Prof Dr Jean-Laurent Casanova.

A caracterização fenotípica desses pacientes consistiu em ensaio com sangue total estimulado em 3 situações: BCG vivo, BCG vivo e IFN γ , BCG vivo e IL-12. Após o estímulo era avaliada por método ELISA a produção de IL-12 e IFN γ (Feinberg et al., 2004).

1.2. Obtenção de células B imortalizadas

Amostras de sangue periférico de pacientes com diagnóstico prévio de defeitos do eixo IL12/23-IFN γ , Doença Granulomatosa Crônica e controles normais e foram obtidas conforme item 5.1.1.1. deste capítulo.

O sangue total foi fracionado por centrifugação em Ficoll-Hypaque (Boyum, 1968) e a fração de células mononucleares cultivadas com sobrenadantes da linhagem B95-8, produtora de EBV (Condino-Neto and Newburger, 1998), e após a transformação com EBV, os linfócitos B foram cultivados em meio DMEM com 5% soro humano AB, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, a 37°C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO₂.

Os linfócitos B-EBV comprovadamente reproduzem as características de atividade e expressão gênica do sistema NADPH oxidase (Condino-Neto and Newburger, 1998) e portanto são passíveis de utilização neste projeto.

Tabela 1: Pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ avaliados neste estudo.

Paciente	Gene, tipo de defeito, herança	Mutação
IFNGR2-c (a)	<i>IFNGR2</i> ; defeito completo; AR	T168N/T168N
IFNGR2-c (b)	<i>IFNGR2</i> ; defeito completo; AR	278delAG/278delAG
IFNGR2-pd	<i>IFNGR2</i> ; defeito parcial, AR	R114C/R114C
IFNGR1-c	<i>IFNGR1</i> ; defeito completo; AR	453delT/453delT
IFNGR1-pr	<i>IFNGR1</i> ; defeito parcial; AR	I87T/I87T
IFNGR1-pd	<i>IFNGR1</i> ; defeito parcial, AD	818del4/WT
IL12RB1 (a)	<i>IL12RB1</i> ; defeito completo; AR	Y88X/Y88X
IL12RB1 (b)	<i>IL12RB1</i> ; defeito completo; AR	Q32X/Q32X

1.3. Ativação das células B-EBV pelo IFN γ

Linfócitos B-EBV de 6 controles normais, 3 pacientes X91⁰DGC (Tabela 6) e 8 pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ (Tabela 5) foram ativados com IFN γ na proporção de 10³UI em 500 μ l de RPMI para cada 2,5x10⁶ células durante 15 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida com PBS 1x gelado, o conteúdo centrifugado a 1800rpm durante 5 minutos a 4°C, e as células foram ressuspensas em Hanks, para dosagem de liberação de superóxido ou Trizol, para extração de RNA.

Tabela 2: Pacientes X910DGC utilizados para comparação com controle normal e pacientes com defeito do eixo IL12/23-IFN γ

Paciente	Mutação no gene <i>CYBB</i>
X91 ⁰ DGC (a)	c.264G>A
X91 ⁰ DGC (b)	c.1164-2A>G
X91 ⁰ DGC (c)	R157X

5.4 Dosagem do ânion superóxido liberado por células B-EBV

A dosagem de liberação do ânion superóxido foi realizada conforme descrito no item 5.1.1.4, salvo pelo tipo de célula utilizada (B-EBV) e pelas condições de ativação das células (Tabela 7).

Tabela 3: Condições de estímulos para dosagem de ânion superóxido em células B-EBV de controles normais, X910DGC e defeitos do eixo IL12/23-IFN γ

Células em repouso (esp)	Células estimuladas com PMA (PMA)	Células estimuladas com IFN γ (IFN)	Células estimuladas com IFN γ e posteriormente com PMA (IFN/PMA)
--------------------------	-----------------------------------	--	---

5.5 Expressão do gene *CYBB* por PCR em tempo real (RQ-PCR)

Amostras de RNA total de células B EBV-transformadas (5×10^6 células/ml) foram preparadas através do reagente TRIZOL. O cDNA foi obtido utilizando-se o kit SuperScript II RT (GIBCO BRL). Para a reação usou-se 2 µg de RNA total, hexâmeros randômicos e (MMLV-RT). O cDNA foi ampliado por meio de PCR em tempo real, através do sistema SYBR Green Real Time (Applied Biosystems). O gene escolhido para controle interno da reação foi o gene da β -Actina (NM 001101).

5.6 Análise Estatística

Os dados clínicos obtidos na anamnese e revisão de prontuários foram submetidos à análise exploratória. As comparações entre os dois grupos foi feita pelo teste exato de FISHER, levando-se em consideração o nível de significância de 5% (Levin, 1987).

Os dados obtidos das avaliações funcionais e expressão gênica foram analisados pelo método ANOVA com pós-teste de Tukey pelo programa GraphPad Prism version 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

6. Resultados

1.1. Avaliação clínica e funcional de pacientes candidatos a DGC e correlação com quadro clínico de defeito do eixo IL12/23-IFN γ

A casuística de pacientes candidatos a DGC incluiu 104 pacientes latino-americanos encaminhados segundo protocolos de cooperação científica estabelecidos respectivamente pelo Grupo Brasileiro de Imunodeficiências (BRAGID, www.imunopediatria.org.br) e Grupo Latino-Americano de Imunodeficiências (LAGID, www.boletin-lagid.lsumc.edu/default.htm).

Os 104 pacientes candidatos a DGC foram submetidos a avaliação de dados clínicos, teste de NBT e/ou dosagem da liberação de ânion superóxido por neutrófilos e monócitos. Entre estes pacientes, 54 apresentaram alteração funcional do sistema NADPH oxidase característica de DGC, sendo 31 brasileiros, 16 mexicanos, 4 chilenos, dois paraguaios e um colombiano; 42 do sexo masculino e 12 do sexo feminino.

A idade dos pacientes DGC variou de 15 dias a 5 anos para início dos sintomas (média 14,6 meses e mediana 7,25), e 1 mês a 14 anos para o diagnóstico (média de 46,39 meses e mediana de 36 meses). A média de tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 32,31 meses, sendo que 2 diagnósticos foram estabelecidos logo ao primeiro sintoma e o diagnóstico mais tardio aconteceu 13 anos após o início dos sintomas.

No grupo sem alteração funcional do sistema NADPH oxidase (n=50) todos eram brasileiros, sendo 23 do sexo masculino e 27 do sexo feminino. A idade de início dos sintomas foi de 15 dias de vida a 7 anos (média 19,9 meses e mediana 42,25 meses).

Chamamos atenção para os dados clínicos com diferença estatística significativa entre os 2 grupos de pacientes, iniciando pelas infecções apresentadas (Figura 4).

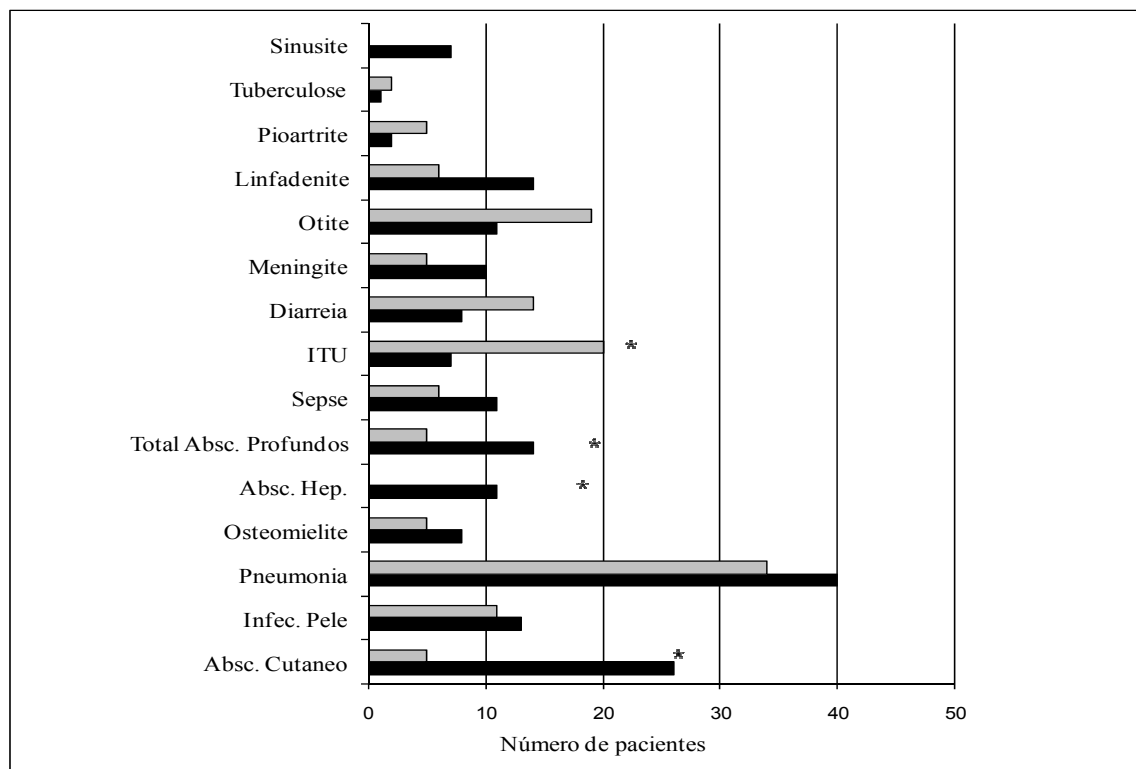


Figura 1: Infecções apresentadas com maior frequência no grupo de pacientes com diagnóstico de DGC (n=54) e no grupo de pacientes em que não se confirmou DGC (n=50). Marcadas com (*) quando $p < 0,05$.

Entre as infecções apresentadas pelos pacientes, destacam-se: abscesso cutâneo ($p=0,0001$), linfadenite ($p=0,0784$), abscessos profundos ($p=0,0395$), infecções do trato urinário ($p=0,0034$). Abscesso hepático foi o mais comum entre os abscessos profundos, com uma forte associação ao grupo DGC ($p=0,0005$). Pneumonia foi uma infecção importante nos 2 grupos ($n=40$ no grupo DGC e $n=34$ no grupo não DGC) (Figura 4).

Entre os pacientes com histórico de infecção do trato urinário no grupo de não DGC ($n=20$) 5 apresentavam mal formações no trato genitourinário.

História familiar de infecções de repetição esteve presente nos dois grupos, porém predominou no grupo DGC ($n=31$) ($p=0,0001$) (Figura 5). Entre esses pacientes, apenas 5 foram encaminhados para avaliação de imunodeficiência primária devido à história familiar de infecção de repetição, sendo que no grupo DGC 9 pacientes já tinham irmãos com o diagnóstico da doença.

Em relação às reações adversas à vacina contra tuberculose (BCG), no grupo DGC 6 pacientes não receberam esta vacina, e entre os pacientes vacinados ocorreu reação adversa em 11 ($p=0,0147$) (Figura 6). Entre as reações apresentadas encontram-se três reações de BCG disseminada e 8 BCGítes no grupo DGC, não ocorrendo reação disseminada no grupo não-DGC.

Todos os pacientes com defeito de eixo IL12/23-IFN γ apresentaram infecções por micobactérias e os pacientes com defeito na cadeia $\beta 1$ do receptor de IL12 apresentaram também infecção por *Salmonella*.

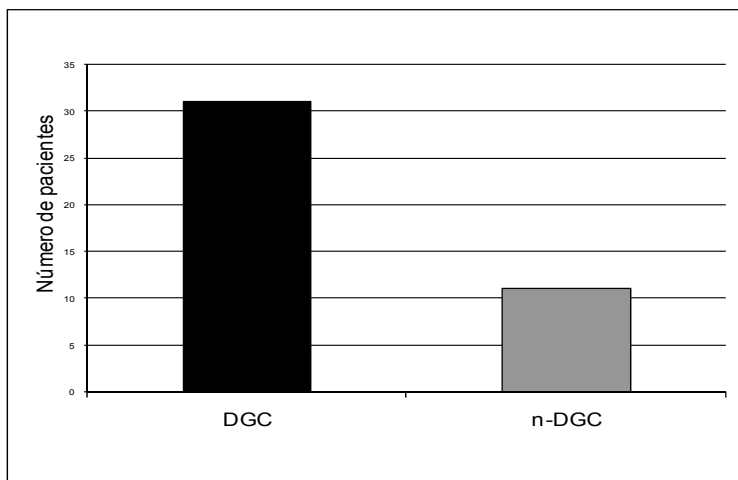


Figura 2: História familiar de infecção de repetição. Gráfico representativo do número de pacientes que referia história familiar de infecção de repetição no grupo com diagnóstico de DGC (n=31) e no grupo em que não se confirmou o diagnóstico de DGC (n=11).

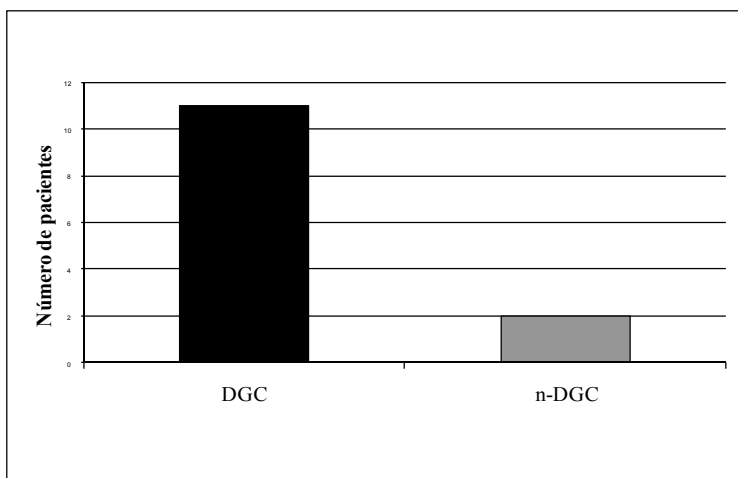


Figura 3: Reação adversa à vacina BCG. Gráfico representativo do número de pacientes que apresentou reação adversa à vacina BCG no grupo com diagnóstico de DGC (n=11) e no grupo em que não se confirmou o diagnóstico de DGC (n=2).

Os agentes etiológicos isolados em vigência de processos infecciosos estão listados na tabela abaixo (Tabela 8).

Tabela 1: Agentes infecciosos como causa de infecções nos pacientes DGC e não DGC.

Local	Grupo DGC	Grupo não-DGC
Pulmão	<i>Acinetobacter</i> ; <i>Burkholderia cepacea</i> ; <i>Candida sp</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Klebsiella sp</i> ; <i>Pneumococcus sp</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Serratia marcescens</i> ;	<i>B.catarrhalis</i> ; <i>Clamídia</i> ; <i>Haemophilus influenza</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; <i>Pneumococcus sp</i> ; <i>Penicillium sp.</i> ;
Pele	<i>S. aureus</i> ;	<i>Acinetobacter</i> ; <i>S. pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S.aureus</i> ;
Trato Gastrointestinal	<i>Giardia lamblia</i> <i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>
Sepse	<i>Candida</i> <i>Pseudomonas cepacea</i> ; <i>Propionibacterium sp</i> ;	<i>Proteus</i> <i>S.aureus</i>
Osso	<i>Serratia marcescens</i>	<i>S.aureus</i>
Articulação	<i>Candida</i> <i>Klebsiella SP</i>	<i>Mycobacterium sp</i> <i>S.aureus</i>
Linfonodo	<i>Klebsiella sp</i> <i>Micobacterium tuberculosis</i> <i>Pseudomonas cepacea</i> <i>Serratia marcescens</i> , <i>S.epidermidis</i> <i>S.aureus</i>	
Fígado	<i>Citrobacter</i> <i>Micobacterium sp</i> <i>S.aureus</i> <i>S. hominis</i>	
Rim	<i>S. aureus</i>	
Cérebro	<i>Serratia marcescens</i>	<i>S. aureus</i>
Meninges		<i>Klebsiella sp</i> <i>P. mirabilis</i>
Trato urinário baixo	<i>Candida sp</i> <i>E.coli</i> , <i>P. mirabilis</i> <i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i> <i>Klebsiella P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> <i>Pneumococcus sp</i> <i>Penicillium</i> <i>Streptococcus sp</i>

1.2. Estudo da atividade do sistema NADPH oxidase em células B-EBV de pacientes com defeitos no eixo IL12/23-IFN γ , X91⁰DGC e controles normais

O estudo da função do sistema NADPH oxidase em linfócitos B-EBV mostrou déficit importante na liberação de ânion superóxido após estímulo com PMA nas células de pacientes com DGC por defeito no gene *CYBB* X91⁰DGC, com ausência de resposta também ao estímulo com IFN γ (Figura 7).

Os ensaios de liberação de ânion superóxido foram realizados tendo sempre 2 controles normais e 2 pacientes X91⁰DGC para cada grupo de defeitos do eixo IL12-23/IFN γ . Estes experimentos foram repetidos 5 vezes para cada paciente estudado.

Após a determinação da atividade NADPH oxidase do paciente X91⁰DGC em relação ao controle normal, a determinação da liberação de O₂⁻ foi avaliada, sob as mesmas condições deste primeiro ensaio utilizando-se células B-EBV de pacientes com defeitos nos receptores 1 e 2 do IFN γ e cadeia β 1 do receptor de IL12 (Figuras 8, 9 e 10).

Os resultados foram submetidos a análise estatística pelo método ANOVA com pós-teste de Tukey pelo programa GraphPad Prism version 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Os resultados com P<0,05 estão identificados nos gráficos com asterisco (*), sendo os valores de P<0,0001 identificados como (***).

Quando comparada a liberação de ânion superóxido pelas células B-EBV não ativadas, não observamos diferenças na atividade NADPH oxidase entre todos os pacientes estudados e controles normais.

Nas células B-EBV de um paciente com defeito no receptor 2 do IFN γ [(IFNGR2-c (a))] houve um discreto aumento na atividade deste sistema, e para os pacientes com defeito no receptor 1 (formas completa e parcial recessiva) houve aumento significativo da atividade do sistema NADPH oxidase. Entretanto, esse aumento não atinge os níveis de atividade dos controles normais. Estes resultados se repetem mesmo quando o estímulo com PMA é aplicado a células previamente ativadas com IFN γ , demonstrando a incapacidade destas células responderem de forma ideal ao estímulo desta citocina.

As células B-EBV do paciente com defeito parcial recessivo no receptor 1 do IFN γ apresentaram resposta semelhante aos controles normais após estímulo com PMA, entretanto, a ativação prévia com IFN γ não foi capaz de incrementar ainda mais a atividade do sistema, como ocorre nos controles normais.

Estudamos 2 pacientes com defeito na cadeia β 1 do receptor de IL12, que se comportaram de maneiras distintas com relação a atividade do sistema NADPH oxidase. O paciente IL12RB1(a) responde de forma semelhante a um controle normal ao estímulo com PMA, entretanto, mais uma vez observa-se que o estímulo com PMA em células previamente ativadas com IFN γ não resultou em maior ativação do sistema NADPH oxidase.

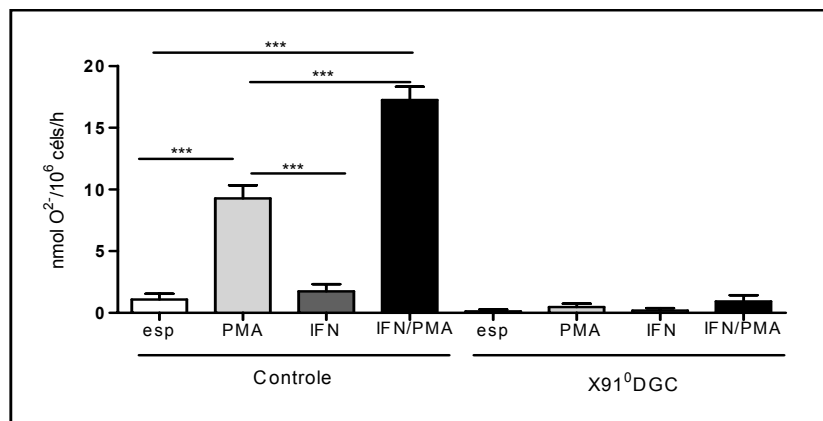


Figura 4: Liberação de superóxido por células B-EBV de X91⁰DGC e controle normal.

Liberação de O₂⁻ nas seguintes condições: (esp), estímulo com PMA (PMA) □, estímulo com IFN γ (IFN) ■ e PMA ■ em células previamente estimuladas com IFN γ ■. (ANOVA com pós-teste de Tukey; n=5; *** p<0,001)

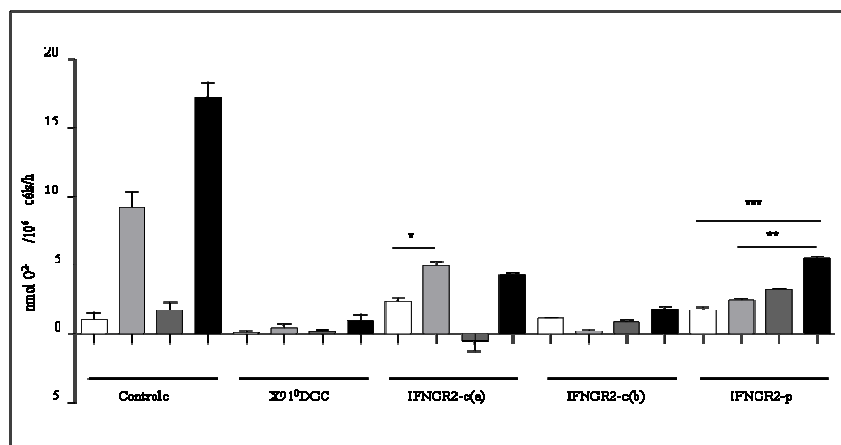


Figura 5: Liberação de superóxido por células B-EBV de pacientes com defeitos no

receptor 2 de IFN γ , X91⁰DGC e controle normal. Liberação de O₂⁻ nas seguintes condições: espontâneo(□ , esp), estímulo com PMA (□ , PMA), estímulo com IFN γ (■, IFN) e PMA em células previamente estimuladas com IFN γ (■ , IFN/PMA). (ANOVA com pós-teste de Tukey, n= 5, *** p<0,001; **0,001<p<0,01, *0,01<p<0,05)

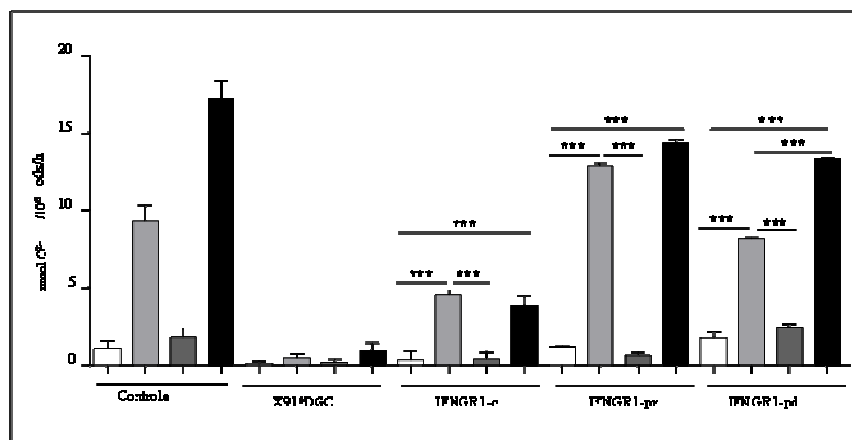


Figura 6: Liberação de superóxido por células B-EBV de pacientes com defeitos no receptor 1 de IFN γ , X91⁰DGC e controle normal. Liberação de O₂⁻ nas seguintes condições: espontâneo($\square$, esp), estímulo com PMA ($\square$, PMA), estímulo com IFN γ ($\square$, IFN) e PMA em células previamente estimuladas com IFN γ ($\blacksquare$, IFN/PMA). (ANOVA com pós-teste de Tukey, n= 5, *** p<0,001)

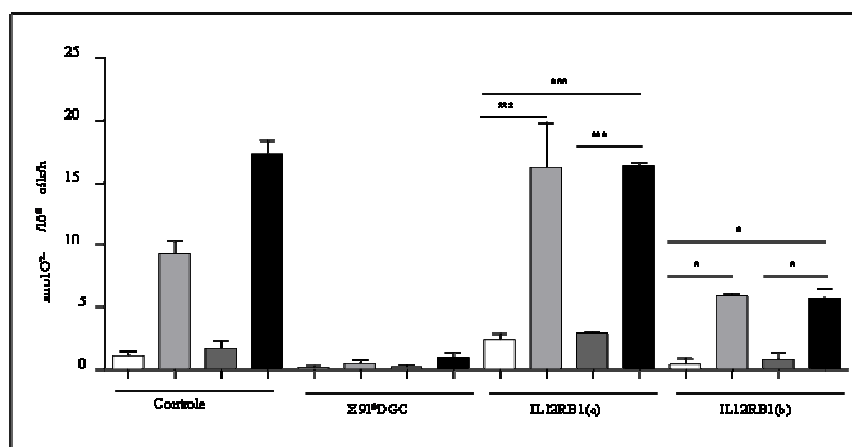


Figura 7: Liberação de superóxido por células B-EBV de pacientes com defeitos da cadeia β 1 do receptor de IL12, X91⁰DGC e controle normal. Liberação de O₂⁻ nas seguintes condições: espontâneo($\square$, esp), estímulo com PMA ($\square$, PMA), estímulo com IFN γ ($\square$, IFN) e PMA em células previamente estimuladas com IFN γ ($\blacksquare$, IFN/PMA). (ANOVA com pós-teste de Tukey, n= 5, *** p< 0,05)

1.3. Estudo da expressão do gene *CYBB* em células B-EBV de pacientes com defeitos no eixo IL12/23-IFN γ , X91⁰DGC e controles normais

Da mesma forma que inicialmente avaliamos a atividade NADPH oxidase de X91⁰DGC em relação a controles normais, procedemos com a avaliação da expressão do gene *CYBB* em células B-EBV. O resultado obtido mostra que mesmo em condições basais, o nível de expressão do gene *CYBB* em células B-EBV de pacientes X91⁰DGC é significativamente inferior à dos controles normais. Após estímulo com IFN γ há aumento expressivo da expressão de *CYBB* nas células dos controles normais, ao passo que o nível de expressão mantém-se inalterado nas células dos pacientes X91⁰DGC (Figura 11).

Uma vez estabelecido baixo nível de expressão do gene *CYBB* nas células B-EBV de pacientes X91⁰DGC em condições basais e ausência de resposta ao estímulo de IFN γ , iniciamos a análise de expressão do gene *CYBB*, antes e após estímulo com IFN γ , em células B-EBV de pacientes com defeito nos receptores 1 e 2 do IFN γ , e cadeia β 1 do receptor de IL12 (Figuras 12, 13 e 14).

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados sempre com 2 controles normais e 2 pacientes X91⁰DGC para cada grupo de defeitos do eixo IL12-23/IFN γ . Estes ensaios foram realizados simultaneamente à quantificação de ânion superóxido (n=5).

Os resultados foram submetidos a análise estatística pelo método ANOVA com pós-teste de Tukey pelo programa GraphPad Prism version 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Os resultados

com $P < 0,05$ estão identificados nos gráficos com asterisco (*), sendo os valores de $P < 0,0001$ identificados como (***).

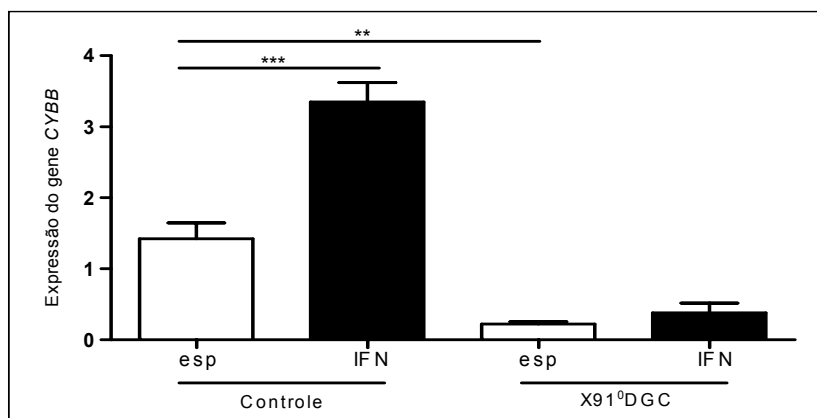


Figura 8: Expressão relativa do gene *CYBB* por PCR em tempo real em células B-EBV de pacientes com X91⁰DGC e controles normais. Condições basais (esp) □ e após estímulo com IFN γ (IFN) ■. (ANOVA com pós-teste de Tukey, n= 5, *** $p < 0,001$; ** $0,001 < p < 0,01$).

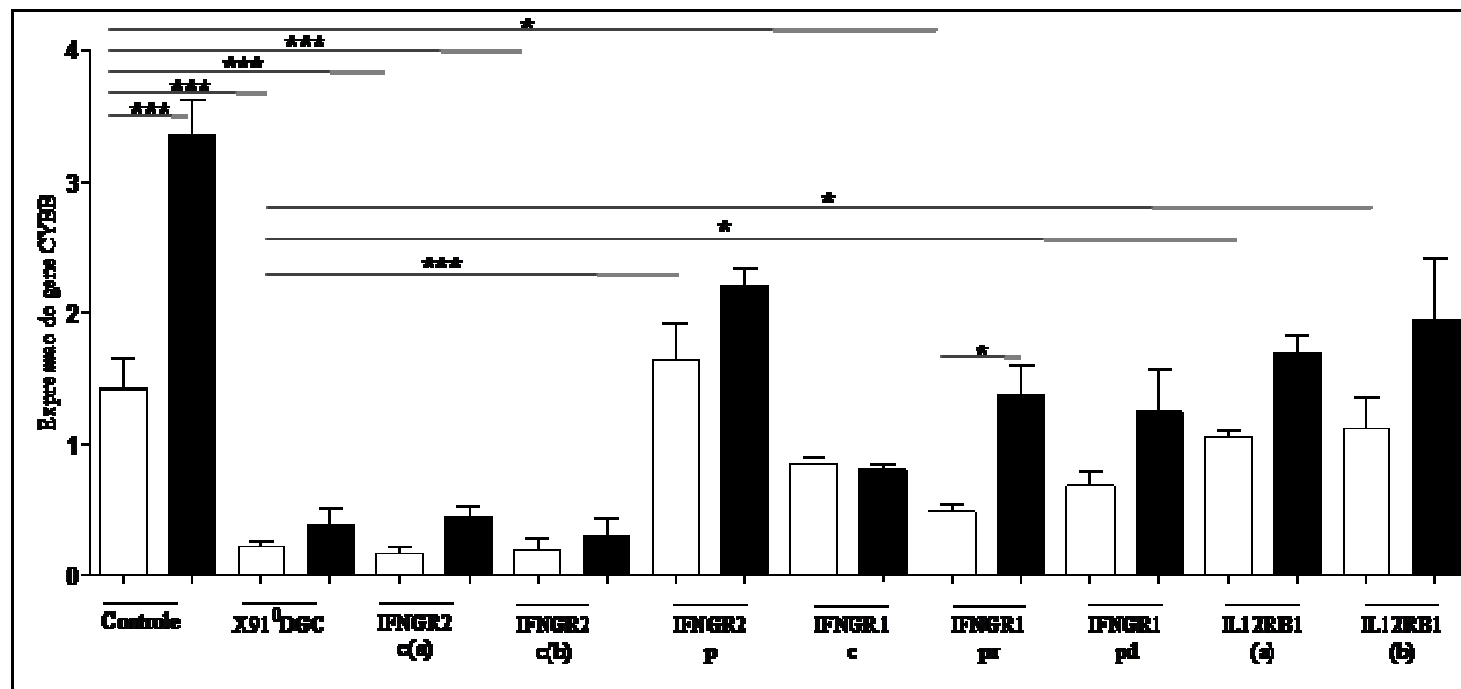


Figura 9: Expressão relativa do gene *CYBB* (PCR em tempo real) por células B-EBV de pacientes com defeito no receptor 2 de IFN γ , pacientes com defeito no receptor 1 de IFN γ , pacientes com defeito na cadeia B1 do receptor de IL12, X91⁰DGC e controles normais. Condições basais (esp) □ e após estímulo com IFN γ (IFN) ■. (ANOVA com pós-teste de Tukey, n=5, ***p<0,001, *p<0,05).

7. Discussão

Este trabalho teve início com o estudo clínico de pacientes encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação em Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas com o propósito de avaliação da atividade do sistema NADPH oxidase devido à hipótese diagnóstica de DGC.

Ao todo 104 pacientes com suspeita de DGC foram analisados, e o defeito de ativação do sistema NADPH oxidase foi confirmado em 54 pacientes.

As infecções pulmonares são a forma mais comum de infecção invasiva na DGC (Forrest et al., 1988; Gallin and Buescher, 1983; Mouy et al., 1989; Winkelstein et al., 2000) e estiveram presentes em número expressivo de pacientes DGC e não-DGC. O envolvimento pulmonar na DGC está associado a aumento significativo da morbidade e da mortalidade, uma vez que pneumonias de repetição podem evoluir para bronquiectasia e fibrose pulmonar.

A única infecção que predominou no grupo não-DGC foi infecção em trato urinário. De fato, infecções urinárias de repetição têm maior associação com fatores hormonais e anatômicos do que imunológicos (Hextall, 2000; Hooton, 2001; Maloney, 2002; Nuutinen and Uhari, 2001; Winiecka et al., 2002). No grupo de pacientes não-DGC 5 apresentavam mal formação em trato geniturinário. Por não se tratar de infecção comum na DGC, é prudente a investigação da anatomia das vias urinárias e da possibilidade de granulomas causando obstrução em vias urinárias de pacientes com DGC apresentando infecção urinária de repetição.

A presença de história familiar de infecção de repetição apresentou forte associação com o grupo DGC, sendo que de 31 pacientes com este dado positivo, 5 de 9

pacientes com irmãos previamente diagnosticados para DGC, foram encaminhados para avaliação antes do início de processos infecciosos graves.

Os pacientes de ambos os grupos apresentavam infecções causadas por agentes comuns na DGC. Nestes pacientes há maior suscetibilidade a bactérias catalase-positivas, bem como germes intracelulares e oportunistas. O *Staphylococcus aureus* foi o agente isolado com maior frequência. Entretanto, a *Burkholderia cepacea*, apresentada na literatura como altamente específica para DGC, foi isolada em apenas dois pacientes com DGC, como causa de pneumonia e sepse em um paciente e adenite em outro (Speert et al., 1994). O *Aspergillus* é um patógeno importante como causa de pneumonia na DGC, e foi causa de pneumonia em um paciente do grupo DGC.

Infecções por micobactérias estiveram presente predominantemente no grupo não-DGC. Entretanto, se considerarmos as reações à vacina BCG, constatamos uma incidência de cerca de 20% nos pacientes DGC. Este resultado não consta nas grandes séries de pacientes com DGC, porém pode ser explicado pelo fato de que a BCG não é uma vacina obrigatória em todos os países. Como a BCG pode causar doença grave, disseminada, com evolução para óbito em pacientes com imunodeficiência fagocitária e celular, temos na América Latina, o compromisso de alertar os profissionais de saúde e a população para os riscos da vacina BCG em pacientes imunodeficientes.

No Brasil o IFN γ humano recombinante não é autorizado a entrar no mercado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, comprometendo os benefícios que os pacientes poderiam ter com o uso regular desta citocina. Por outro lado, observa-se que nem todos os pacientes DGC beneficiam-se de forma significativa do uso do IFN γ . Isto é objeto de estudo em nosso laboratório através da investigação dos efeitos

do IFN γ na atividade e expressão dos genes da NADPH oxidase em pacientes DGC por erros de *splicing* no gene *CYBB*.

Considerando a suscetibilidade a infecções por micobactérias tanto nos pacientes DGC quanto nos pacientes com defeitos no eixo IL12/23-IFN γ , e a importância do IFN γ para o desenvolvimento, ativação e regulação do sistema NADPH oxidase, partimos para o estudo da atividade e expressão de *CYBB* num grupo de pacientes com defeitos do eixo IL12-23/IFN γ .

Nossos resultados mostram que a atividade do sistema NADPH oxidase após estímulo com PMA é nula em 3 pacientes X91⁰DGC. Para um paciente com defeito no receptor 2 do IFN γ [(IFNGR2-c (a))] houve um discreto aumento na atividade deste sistema, e para os pacientes com defeito no receptor 1 (formas completa e parcial recessiva) há aumento significativo da atividade do sistema NADPH oxidase. Entretanto, esse aumento não atinge os níveis de atividade dos controles normais. Estes resultados se repetem mesmo quando o estímulo com PMA é aplicado a células previamente ativadas com IFN γ , demonstrando a incapacidade destas células responderem de forma ideal ao estímulo desta citocina.

As células B-EBV do paciente com defeito parcial recessivo no receptor 1 do IFN γ apresentaram resposta semelhante aos controles normais após estímulo com PMA, entretanto, a ativação prévia com IFN γ não foi capaz de incrementar ainda mais a atividade do sistema, como ocorre nos controles normais.

Estudamos 2 pacientes com defeito na cadeia β 1 do receptor de IL12, que se comportaram de maneiras distintas com relação à atividade do sistema NADPH oxidase. O paciente IL12RB1(a) responde de forma semelhante a um controle normal ao estímulo com PMA, entretanto, mais uma vez observa-se que o estímulo com PMA

em células previamente ativadas com IFN γ não resultou em maior ativação do sistema NADPH oxidase.

Os estudos de expressão do gene *CYBB* apontam também para a importância do IFN γ no adequado funcionamento do sistema NADPH oxidase. Observa-se um aumento significativo no nível de expressão do gene *CYBB* nas células B-EBV de controles normais, ausência de resposta nos casos de pacientes X91⁰DGC, bem como para os pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ aqui estudados, com exceção de um discreto aumento na resposta ao IFN γ no paciente IFNGR1-pr.

Mesmo a expressão basal do *CYBB* é reduzida em alguns dos pacientes estudados. IFNGR2-c(a) e IFNGR2-c(b) apresentam nível de expressão basal de *CYBB* reduzidos e semelhantes aos dos pacientes DGC.

Em especial, os pacientes com defeito completo do receptor 2 de IFN γ apresentam fenótipo celular semelhante ao de um paciente X91⁰DGC. Para os demais pacientes, observamos variabilidade no padrão de resposta ao estímulo com PMA e/ou IFN γ , entretanto, sem que esta resposta atinja níveis comparáveis aos de controle normal em todas as situações testadas. Isto demonstra o papel crucial do efeito do IFN γ sobre o gene *CYBB* e conseqüentemente sobre o adequado funcionamento do sistema NADPH oxidase.

Se os resultados deste trabalho apontam para um fenótipo celular em defeitos do eixo IL12/23-IFN γ igual ou próximo ao de um paciente com X91⁰DGC, porque então pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ não apresentam as mesmas características clínicas dos pacientes DGC, com infecções por agentes importantes para DGC, como *Staphylococcus aureus* ou *Aspergillus*?

Em primeiro lugar é importante ressaltar que no início das descobertas dos defeitos do eixo IL12/23-IFN γ , em 1996, esta entidade era denominada MSMD e os únicos agentes infecciosos relacionados eram as micobactérias não virulentas. Em 12 anos de estudo novos genes e variantes alélicas foram identificados, bem como o número de pacientes diagnosticados aumentou. Novos agentes começaram a ser identificados: *Salmonella* está presente em cerca de 50% dos pacientes com defeitos na subunidade p40 da IL-12 e da cadeia β 1 do receptor de IL-12; *Nocardia* e *Paracoccidioidomyces* foram também identificados, além de infecções por *Mycobacterium tuberculosis*. A identificação de novos agentes infecciosos motivou a substituição da nomenclatura MSMD por “Defeitos do eixo IL12/23-IFN γ ”. É provável que com o aumento do número de casos diagnosticados novos agentes infecciosos passem a ser identificados. Devemos considerar que estamos comparando 12 anos de estudo e cerca de 220 pacientes com defeitos do eixo IL12/23-IFN γ (IFNGR2 completo n=9; IFNGR1 completo n=22 pacientes; IFNGR1 parcial recessivo n=26; INGR1 parcial dominante n=38; Stat1 n=10; IL12p40 n=20; IL12RB1 n=86) (Filipe-Santos et al.) com quase 50 anos de estudo e cerca de 800 pacientes com DGC (Agudelo-Florez et al., 2006b; Barese et al., 2004; Liese et al., 2000; Winkelstein et al., 2000).

Outro ponto relevante é a conhecida redundância de funções no sistema de citocinas. Assim, outras citocinas, que não IL12, IL23 ou IFN γ poderiam atuar no controle de outros agentes que não os identificados até o momento nos defeitos do eixo IL12/23-IFN γ . Para o sistema NADPH oxidase, ao contrário, não existe em humanos, outro sistema com atividade biológica redundante, e isso poderia explicar a maior diversidade de patógenos relacionados. Em murinos o sistema oxido nítrico sintase é induzível pelo IFN γ e a produção de reativos do nitrogênio pode contribuir para a

defesa contra infecções, o que de fato parece ocorrer uma vez que camundongos com mutação em *p47-phox* e *gp91-phox* têm quadro clínico mais ameno do que humanos com mutação nestas proteínas (Condino-neto et al., 1996; Condino-Neto et al., 1993).

Além disso, o único fator estimulador para o desenvolvimento e ativação da NADPH oxidase testado neste trabalho foi o $\text{IFN}\gamma$. Se outros fatores de transcrição promoverem, ao menos em parte, o desenvolvimento, ativação e regulação do sistema NADPH oxidase, a quantidade de reativos do oxigênio liberados poderia ser suficiente para controlar a maioria dos agentes infecciosos que aparecem na DGC. É sabido que em pacientes com DGC submetidos a transplantes de células tronco hematopoiéticas, se o quimerismo resultante do procedimento for de 15 a 20% de granulócitos do doador, os pacientes vivem livres de infecções graves (Del Giudice et al., 2003; Hasegawa et al., 2008; Kansoy et al., 2006; Schuetz et al., 2007; Seger, 2008).

Outro fator limitante deste trabalho deve-se ao tipo de célula utilizada para os ensaios. As células B-EBV reproduzem as características de expressão gênica e atividade do sistema NADPH oxidase (Condino-Neto and Newburger, 1998), entretanto é necessário que estes parâmetros sejam analisados também em células frescas (monócitos, neutrófilos, macrófagos).

No Brasil o diagnóstico e caracterização genético-molecular desses pacientes ainda é incipiente e as linhagens celulares estudadas neste trabalho são de pacientes provenientes da coorte estudada no laboratório de Genética Humana das Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina Necker, Universidade de Paris René Descartes INSERM U550, dificultando o acesso a células frescas dos pacientes que por ventura ainda estejam vivos e não transplantados.

Os resultados deste trabalho juntamente com outros dois recentemente desenvolvidos em nosso grupo (Luengo et al., 2008 e Bustamante et al 2008 – trabalhos anexados) apontam para a necessidade de um novo olhar sobre os defeitos do sistema NADPH oxidase. Mostramos aqui que defeitos na ativação do gene *CYBB* via eixo IL12/23- IFN γ comprometem a ativação do sistema NADPH oxidase, resultando em fenótipo celular equivalente ao de um paciente DGC ou intermediário. Luengo et al mostraram tanto em células transfectadas com vetor mutante para I κ B-alfa, quanto em células B-EBV de pacientes com displasia ectodérmica com imunodeficiência por alterações no NEMO ou I κ B-alfa afetando a via do NF- κ B, que estes defeitos também comprometem a ativação do gene *CYBB* e *NCF1*, e conseqüentemente a atividade do sistema NADPH oxidase.

Em contrapartida, Bustamante et al apresentaram uma família com infecções por micobactérias e mutação no gene *CYBB* até então não descrita em pacientes com XDGC. A possibilidade de acesso a células frescas deste paciente permitiu a análise nos diferentes tipos celulares e constatou-se que esta mutação afetava o desenvolvimento e ativação do gene *CYBB* em subtipos celulares específicos: macrófagos e células B.

Assim, a partir destes estudos, pacientes com alteração da atividade do sistema NADPH oxidase, além da suspeita de DGC clássica, necessitam também investigação do eixo IL12/23-IFN γ e da via do NF- κ B, e pacientes com fenótipo clínico fortemente sugestivo de DGC, mas com avaliação inicial do sistema NADPH oxidase normal merecem avaliação mais detalhada dos subtipos celulares. Assim, somente estudos funcionais completos incluindo todas as linhagens celulares, seguidos de

estudos genético-moleculares poderão definir ao certo o defeito imunológico e os genes envolvidos.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a integridade do eixo IFN-IL12 é crucial para a expressão do gene *CYBB* e ativação da NADPH oxidase. A influência do eixo IFN-IL12 sobre os outros genes *NCF-1*, *NCF-2* e *CYBA* encontra-se em investigação em nosso grupo.

8. Conclusão

História familiar de infecções graves e/ou de repetição, reação adversa à vacina BCG, linfadenopatia e abscessos cutâneos e profundos apresentam associação com grupo de pacientes com DGC.

Defeitos do eixo $\text{IFN}\gamma$ -IL12/23, particularmente dos receptores IFNGR1 e IFNGR2, podem apresentar atividade do sistema NADPH oxidase e expressão do gene *CYBB* semelhantes a um paciente com X-DGC.

9. Referências Bibliográficas

A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. **N Engl J Med** 324: 509-16, 1991.

AGUDELO-FLOREZ, P., NAVARRO, S., LUTTGES, P., LOPEZ, J. A., NORAMBUENA, X., NAVARRETE, S. C., QUEZADA, A., SPENCER, M., CONDINO-NETO, A. and CORNEJO DE, M. [Report of a new mutation in CYBB gene in two patients with X linked chronic granulomatous disease]. **Rev Med Chil** 134: 965-72, 2006a.

AGUDELO-FLOREZ, P., PRANDO-ANDRADE, C. C., LOPEZ, J. A., COSTA-CARVALHO, B. T., QUEZADA, A., ESPINOSA, F. J., DE SOUZA PAIVA, M. A., ROXO, P., JR., GRUMACH, A., JACOB, C. A., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M., NEWBURGER, P. E. and CONDINO-NETO, A. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics. **Pediatr Blood Cancer** 46: 243-52, 2006b.

ALTARE, F., DURANDY, A., LAMMAS, D., EMILE, J. F., LAMHAMEDI, S., LE DEIST, F., DRYSDALE, P., JOUANGUY, E., DOFFINGER, R., BERNAUDIN, F., JEPPSSON, O., GOLLOB, J. A., MEINL, E., SEGAL, A. W., FISCHER, A., KUMARARATNE, D. and CASANOVA, J. L. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. **Science** 280: 1432-5, 1998.

BARESE, C., COPELLI, S., ZANDOMENI, R., OLEASTRO, M., ZELAZKO, M. and RIVAS, E. M. X-linked chronic granulomatous disease: first report of mutations in patients of Argentina. **J Pediatr Hematol Oncol** 26: 656-60, 2004.

BEI, L., LU, Y. and EKLUND, E. A. HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation. **J Biol Chem** 280: 12359-70, 2005.

BEMILLER, L. S., ROBERTS, D. H., STARKO, K. M. and CURNUTTE, J. T. Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. **Blood Cells Mol Dis** 21: 239-47, 1995.

BERENDES, H., BRIDGES, R. A. and GOOD, R. A. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. **Minn Med** 40: 309-12, 1957.

BERENDES, H., BRIDGES, R.A., GOOD, R.A. A fatal granulomatous of childhood: the clinical study of a new syndrome. **Minn Med** 40: 309-21, 1957.

- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl** 97: 77-89, 1968.
- BRIDGES, R. A., BERENDES, H. and GOOD, R. A. A fatal granulomatous disease of childhood. The clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. **Am J Dis Child** 97: 387-408, 1959.
- BRIDGES, R. A., BERENDES, H., GOOD, R. A. A fatal granulomatosis disease of childhood. The clinical, pathological and laboratory features of a new syndrome. **Am J Dis Child** 97: 387-408, 1959.
- BURG, N. D. and PILLINGER, M. H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clin Immunol** 99: 7-17, 2001.
- CASANOVA, J. L., BLANCHE, S., EMILE, J. F., JOUANGUY, E., LAMHAMEDI, S., ALTARE, F., STEPHAN, J. L., BERNAUDIN, F., BORDIGONI, P., TURCK, D., LACHAUX, A., ALBERTINI, M., BOURRILLON, A., DOMMERGUES, J. P., POCIDALO, M. A., LE DEIST, F., GAILLARD, J. L., GRISCELLI, C. and FISCHER, A. Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guerin infection: a French national retrospective study. **Pediatrics** 98: 774-8, 1996.
- CASSATELLA, M. A., FLYNN, R. M., AMEZAGA, M. A., BAZZONI, F., VICENTINI, F. and TRINCHIERI, G. Interferon gamma induces in human neutrophils and macrophages expression of the mRNA for the high affinity receptor for monomeric IgG (Fc gamma R-I or CD64). **Biochem Biophys Res Commun** 170: 582-8, 1990.
- CATT, D., HAWKINS, S., ROMAN, A., LUO, W. and SKALNIK, D. G. Overexpression of CCAAT displacement protein represses the promiscuously active proximal gp91(phox) promoter. **Blood** 94: 3151-60, 1999.
- CHENG, S. S. and KUNKEL, S. L. The evolving role of the neutrophil in chemokine networks. **Chem Immunol Allergy** 83: 81-94, 2003.
- CHIN, T. W., STIEHM, E. R., FALLOON, J. and GALLIN, J. I. Corticosteroids in treatment of obstructive lesions of chronic granulomatous disease. **J Pediatr** 111: 349-52, 1987.

- CLARK, R. A., VOLPP, B. D., LEIDAL, K. G. and NAUSEEF, W. M. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. **J Clin Invest** 85: 714-21, 1990.
- CONDINO-NETO, A., MUSCARA, M. N., BELLINATI-PIRES, R., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M., BRANDAO, A. C., GRUMACH, A. S. and DE NUCCI, G. Effect of therapy with recombinant human interferon-gamma on the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. **J Interferon Cytokine Res** 16: 357-64, 1996.
- CONDINO-NETO, A., MUSCARA, M. N., GRUMACH, A. S., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. and DE NUCCI, G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. **Br J Clin Pharmacol** 35: 485-90, 1993.
- CONDINO-NETO, A. and NEWBURGER, P. E. NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. **Arch Biochem Biophys** 360: 158-64, 1998.
- CONDINO-NETO, A. and NEWBURGER, P. E. 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** 95: 3548-54, 2000.
- CONDINO-NETO, A., WHITNEY, C. and NEWBURGER, P. E. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. **J Immunol** 161: 4960-7, 1998.
- CONLEY, M. E., NOTARANGELO, L. D. and ETZIONI, A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). **Clin Immunol** 93: 190-7, 1999.
- DEL GIUDICE, I., IORI, A. P., MENGARELLI, A., TESTI, A. M., ROMANO, A., CERRETTI, R., MACRI, F., IACOBINI, M. and ARCESE, W. Allogeneic stem cell

transplant from HLA-identical sibling for chronic granulomatous disease and review of the literature. **Ann Hematol** 82: 189-92, 2003.

DINAUER, M. C., ORKIN, S. H., BROWN, R., JESAITIS, A. J. and PARKOS, C. A. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. **Nature** 327: 717-20, 1987.

DINAUER, M. C., PIERCE, E. A., BRUNS, G. A., CURNUTTE, J. T. and ORKIN, S. H. 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: 1729-37, 1990.

DINAUER, M. C., PIERCE, E. A., ERICKSON, R. W., MUHLEBACH, T. J., MESSNER, H., ORKIN, S. H., SEGER, R. A. and CURNUTTE, J. T. Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88: 11231-5, 1991.

EISERICH, J. P., HRISTOVA, M., CROSS, C. E., JONES, A. D., FREEMAN, B. A., HALLIWELL, B. and VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature** 391: 393-7, 1998.

ENGLISH, D. and ANDERSEN, B. R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. **J Immunol Methods** 5: 249-52, 1974.

EVANS, T. J., BUTTERY, L. D., CARPENTER, A., SPRINGALL, D. R., POLAK, J. M. and COHEN, J. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93: 9553-8, 1996.

EZEKOWITZ, R. A., ORKIN, S. H. and NEWBURGER, P. E. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. **J Clin Invest** 80: 1009-16, 1987.

FEINBERG, J., FIESCHI, C., DOFFINGER, R., FEINBERG, M., LECLERC, T., BOISSON-DUPUIS, S., PICARD, C., BUSTAMANTE, J., CHAPGIER, A., FILIPE-SANTOS, O., KU, C. L., DE BEAUCOUDREY, L., REICHENBACH, J., ANTONI, G.,

- BALDE, R., ALCAIS, A. and CASANOVA, J. L. 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: 3276-84, 2004.
- FIALKOW, L., CHAN, C. K. and DOWNEY, G. P. Inhibition of CD45 during neutrophil activation. **J Immunol** 158: 5409-17, 1997.
- FILIPE-SANTOS, O., BUSTAMANTE, J., CHAPGIER, A., VOGT, G., DE BEAUCOUDREY, L., FEINBERG, J., JOUANGUY, E., BOISSON-DUPUIS, S., FIESCHI, C., PICARD, C. and CASANOVA, J. L. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. **Semin Immunol** 18: 347-61, 2006.
- FINN, A., HADZIC, N., MORGAN, G., STROBEL, S. and LEVINSKY, R. J. Prognosis of chronic granulomatous disease. **Arch Dis Child** 65: 942-5, 1990.
- FORREST, C. B., FOREHAND, J. R., AXTELL, R. A., ROBERTS, R. L. and JOHNSTON, R. B., JR. Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. **Hematol Oncol Clin North Am** 2: 253-66, 1988.
- GALLIN, J. I. and BUESCHER, E. S. Abnormal regulation of inflammatory skin responses in male patients with chronic granulomatous disease. **Inflammation** 7: 227-32, 1983.
- GEHA, R. S., NOTARANGELO, L. D., CASANOVA, J. L., CHAPEL, H., CONLEY, M. E., FISCHER, A., HAMMARSTROM, L., NONOYAMA, S., OCHS, H. D., PUCK, J. M., ROIFMAN, C., SEGER, R. and WEDGWOOD, J. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. **J Allergy Clin Immunol** 120: 776-94, 2007.
- GRUMACH, A. S., DUARTE, A. J., BELLINATI-PIRES, R., PASTORINO, A. C., JACOB, C. M., DIOGO, C. L., CONDINO-NETO, A., KIRSCHFINK, M. and CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Brazilian report on primary immunodeficiencies in children: 166 cases studied over a follow-up time of 15 years. **J Clin Immunol** 17: 340-5, 1997.
- HASEGAWA, D., FUKUSHIMA, M., HOSOKAWA, Y., TAKEDA, H., KAWASAKI, K., MIZUKAMI, T., NUNOI, H., OCHIAI, H., MORIO, T. and KOSAKA, Y.

Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. **Int J Hematol** 87: 88-90, 2008.

HASUI, M., HIRABAYASHI, Y., HATTORI, K. and KOBAYASHI, Y. Increased phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes of chronic granulomatous disease as determined with flow cytometric assay. **J Lab Clin Med** 117: 291-8, 1991.

HAWKINS, S. M., KOHWI-SHIGEMATSU, T. and SKALNIK, D. G. The matrix attachment region-binding protein SATB1 interacts with multiple elements within the gp91phox promoter and is down-regulated during myeloid differentiation. **J Biol Chem** 276: 44472-80, 2001.

HEXTALL, A. Oestrogens and lower urinary tract function. **Maturitas** 36: 83-92, 2000.

HOOTON, T. M. Recurrent urinary tract infection in women. **Int J Antimicrob Agents** 17: 259-68, 2001.

ISHIBASHI, F., MIZUKAMI, T., KANEGASAKI, S., MOTODA, L., KAKINUMA, R., ENDO, F. and NUNOI, H. Improved superoxide-generating ability by interferon gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in CYBB gene. **Blood** 98: 436-41, 2001.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHICK, M.J. Immunobiology. The immune system in health and disease. (6th Edition), Vol. 1: Garland Science Publishing, 2005.

JOUANGUY, E., ALTARE, F., LAMHAMEDI, S., REVY, P., EMILE, J. F., NEWPORT, M., LEVIN, M., BLANCHE, S., SEBOUN, E., FISCHER, A. and CASANOVA, J. L. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. **N Engl J Med** 335: 1956-61, 1996.

KANSOY, S., KUTUKCULER, N., AKSOYLAR, S., AKSU, G., KANTAR, M. and CETINGUL, N. Successful bone marrow transplantation in an 8-month-old patient with chronic granulomatous disease. **Turk J Pediatr** 48: 253-5, 2006.

KARLSSON, A. and DAHLGREN, C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. **Antioxid Redox Signal** 4: 49-60, 2002.

KLEBANOFF, S. J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: role of nitrite. **Free Radic Biol Med** 14: 351-60, 1993.

- KLEBANOFF, S. J. and NATHAN, C. F. Nitrite production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes supplemented with azide and catalase. **Biochem Biophys Res Commun** 197: 192-6, 1993.
- KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front Biosci** 13: 2400-7, 2008.
- LANDING, B. H. and SHIRKEY, H. S. A syndrome of recurrent infection and infiltration of the viscera by pigmented lipid histiocytes. **Pediatrics** 20: 431-42, 1957.
- LEUSEN, J. H., VERHOEVEN, A. J. and ROOS, D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. **J Lab Clin Med** 128: 461-76, 1996.
- LEVIN, J. Testes Não-paramétricos **Estatística Aplicada a Ciências Humanas** (2^o Edition), São Paulo: editora Harbra, 1987, pp. 193-265.
- LEW, P. D., SOUTHWICK, F. S., STOSSEL, T. P., WHITIN, J. C., SIMONS, E. and COHEN, H. J. A variant of chronic granulomatous disease: deficient oxidative metabolism due to a low-affinity NADPH oxidase. **N Engl J Med** 305: 1329-33, 1981.
- LIESE, J., KLOOS, S., JENDROSSEK, V., PETROPOULOU, T., WINTERGERST, U., NOTHEIS, G., GAHR, M. and BELOHRADSKY, B. H. Long-term follow-up and outcome of 39 patients with chronic granulomatous disease. **J Pediatr** 137: 687-93, 2000.
- LIESE, J. G., JENDROSSEK, V., JANSSON, A., PETROPOULOU, T., KLOOS, S., GAHR, M. and BELOHRADSKY, B. H. Chronic granulomatous disease in adults. **Lancet** 347: 220-3, 1996.
- LU, Y., GOLDENBERG, I., BEI, L., ANDREJIC, J. and EKLUND, E. A. HoxA10 represses gene transcription in undifferentiated myeloid cells by interaction with histone deacetylase 2. **J Biol Chem** 278: 47792-802, 2003.
- LUO, W. and SKALNIK, D. G. Interferon regulatory factor-2 directs transcription from the gp91phox promoter. **J Biol Chem** 271: 23445-51, 1996.
- MACLENNAN, C., FIESCHI, C., LAMMAS, D. A., PICARD, C., DORMAN, S. E., SANAL, O., MACLENNAN, J. M., HOLLAND, S. M., OTTENHOFF, T. H., CASANOVA, J. L. and KUMARARATNE, D. S. Interleukin (IL)-12 and IL-23 are key cytokines for immunity against Salmonella in humans. **J Infect Dis** 190: 1755-7, 2004.

- MALONEY, C. Estrogen & recurrent UTI in postmenopausal women. **Am J Nurs** 102: 44-52, 2002.
- MCCORD, J. M. and FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem** 244: 6049-55, 1969.
- MORAES-VASCONCELOS, D., GRUMACH, A. S., YAMAGUTI, A., ANDRADE, M. E., FIESCHI, C., BEAUCCUDREY, L., CASANOVA, J. L. and DUARTE, A. J. Paracoccidioides brasiliensis disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. **Clin Infect Dis** 41: e31-7, 2005.
- MOUY, R., FISCHER, A., VILMER, E., SEGER, R. and GRISCELLI, C. Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease. **J Pediatr** 114: 555-60, 1989.
- NEWBURGER, P. E., LUSCINSKAS, F. W., RYAN, T., BEARD, C. J., WRIGHT, J., PLATT, O. S., SIMONS, E. R. and TAUBER, A. I. Variant chronic granulomatous disease: modulation of the neutrophil defect by severe infection. **Blood** 68: 914-9, 1986.
- NUUTINEN, M. and UHARI, M. Recurrence and follow-up after urinary tract infection under the age of 1 year. **Pediatr Nephrol** 16: 69-72, 2001.
- OCHS, H. D. and IGO, R. P. The NBT slide test: a simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers. **J Pediatr** 83: 77-82, 1973.
- OHNO, Y., BUESCHER, E. S., ROBERTS, R., METCALF, J. A. and GALLIN, J. I. Reevaluation of cytochrome b and flavin adenine dinucleotide in neutrophils from patients with chronic granulomatous disease and description of a family with probable autosomal recessive inheritance of cytochrome b deficiency. **Blood** 67: 1132-8, 1986.
- PACELLI, R., WINK, D. A., COOK, J. A., KRISHNA, M. C., DEGRAFF, W., FRIEDMAN, N., TSOKOS, M., SAMUNI, A. and MITCHELL, J. B. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of Escherichia coli. **J Exp Med** 182: 1469-79, 1995.
- PARKOS, C. A., ALLEN, R. A., COCHRANE, C. G. and JESAITIS, A. J. The quaternary structure of the plasma membrane b-type cytochrome of human granulocytes. **Biochim Biophys Acta** 932: 71-83, 1988.

- PASIC, S., LILIC, D., PEJNOVIC, N., VOJVODIC, D., SIMIC, R. and ABINUN, M. Disseminated Bacillus Calmette-Guerin infection in a girl with hyperimmunoglobulin E syndrome. **Acta Paediatr** 87: 702-4, 1998.
- PATINO, P. J., PEREZ, J. E., LOPEZ, J. A., CONDINO-NETO, A., GRUMACH, A. S., BOTERO, J. H., CURNUTTE, J. T. and GARCIA DE OLARTE, D. Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-phox. **Hum Mutat** 13: 29-37, 1999.
- PICARD, C., FIESCHI, C., ALTARE, F., AL-JUMAAH, S., AL-HAJJAR, S., FEINBERG, J., DUPUIS, S., SOUDAIS, C., AL-MOHSEN, I. Z., GENIN, E., LAMMAS, D., KUMARARATNE, D. S., LECLERC, T., RAFII, A., FRAYHA, H., MURUGASU, B., WAH, L. B., SINNIH, R., LOUBSER, M., OKAMOTO, E., AL-GHONAIUM, A., TUFENKEJI, H., ABEL, L. and CASANOVA, J. L. Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. **Am J Hum Genet** 70: 336-48, 2002.
- PRANDO-ANDRADE, C., AGUDELO-FLOREZ, P., LOPEZ, J. A., PAIVA, M. A., COSTA-CARVALHO, B. T. and CONDINO-NETO, A. [Autosomal chronic granulomatous disease: case report and mutation analysis of two Brazilian siblings]. **J Pediatr (Rio J)** 80: 425-8, 2004.
- QUIE, P. G., WHITE, J. G., HOLMES, B. and GOOD, R. A. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. **J Clin Invest** 46: 668-79, 1967.
- RAE, J., NEWBURGER, P. E., DINAUER, M. C., NOACK, D., HOPKINS, P. J., KURUTO, R. and CURNUTTE, J. T. X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. **Am J Hum Genet** 62: 1320-31, 1998.
- REPINE, J. E., RAO, G., BEALL, G. D. and WHITE, J. G. Inhibition of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation in vitro by nitroblue tetrazolium and vitamin E. **Am J Pathol** 90: 659-74, 1978.
- REPINE, J. E., RASMUSSEN, B. and WHITE, J. G. An improved nitroblue tetrazolium test using phorbol myristate acetate-coated coverslips. **Am J Clin Pathol** 71: 582-5, 1979.

- ROESLER, J., HECHT, M., FREIHORST, J., LOHMANN-MATTHES, M. L. and EMMENDORFFER, A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. **Eur J Pediatr** 150: 161-5, 1991.
- ROOS, D. and CURNUTTE, J. T. Chronic Granulomatous Disease. In: Ochs, H. D., Smith, C. I. E. and Puck, J. M. (Eds.) **Primary Immunodeficiency Diseases: a molecular and genetic approach**, New York: Oxford University Press, 1999, pp. 353-74.
- ROOS, D., DE BOER, M., KURIBAYASHI, F., MEISCHL, C., WEENING, R. S., SEGAL, A. W., AHLIN, A., NEMET, K., HOSSLE, J. P., BERNATOWSKA-MATUSZKIEWICZ, E. and MIDDLETON-PRICE, H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Blood** 87: 1663-81, 1996.
- SCHAPIRO, B. L., NEWBURGER, P. E., KLEMPNER, M. S. and DINAUER, M. C. Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. **N Engl J Med** 325: 1786-90, 1991.
- SCHUETZ, C., HOENIG, M., SCHULZ, A., LEE-KIRSCH, M. A., ROESLER, J., FRIEDRICH, W. and VON BERNUTH, H. Successful unrelated bone marrow transplantation in a child with chronic granulomatous disease complicated by pulmonary and cerebral granuloma formation. **Eur J Pediatr** 166: 785-8, 2007.
- SEGAL, A. W. The molecular and cellular pathology of chronic granulomatous disease. **Eur J Clin Invest** 18: 433-43, 1988.
- SEGAL, A. W. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. **Mol Med Today** 2: 129-35, 1996.
- SEGAL, B. H., LETO, T. L., GALLIN, J. I., MALECH, H. L. and HOLLAND, S. M. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. **Medicine (Baltimore)** 79: 170-200, 2000.
- SEGER, R. A. Modern management of chronic granulomatous disease. **Br J Haematol** 140: 255-66, 2008.
- SHATWELL, K. P. and SEGAL, A. W. NADPH oxidase. **Int J Biochem Cell Biol** 28: 1191-5, 1996.

- SHURIN, S. B., COHEN, H. J., WHITIN, J. C. and NEWBURGER, P. E. Impaired granulocyte superoxide production and prolongation of the respiratory burst due to a low-affinity NADPH-dependent oxidase. **Blood** 62: 564-71, 1983.
- SKALNIK, D. G. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. **Gene** 284: 1-21, 2002.
- SPEERT, D. P., BOND, M., WOODMAN, R. C. and CURNUTTE, J. T. Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: role of nonoxidative killing by neutrophils in host defense. **J Infect Dis** 170: 1524-31, 1994.
- TALBOT, E. A., PERKINS, M. D., SILVA, S. F. and FROTHINGHAM, R. Disseminated bacille Calmette-Guerin disease after vaccination: case report and review. **Clin Infect Dis** 24: 1139-46, 1997.
- WEENING, R. S., ADRIAANSZ, L. H., WEEMAES, C. M., LUTTER, R. and ROOS, D. Clinical differences in chronic granulomatous disease in patients with cytochrome b-negative or cytochrome b-positive neutrophils. **J Pediatr** 107: 102-4, 1985.
- WEENING, R. S., LEITZ, G. J. and SEGER, R. A. Recombinant human interferon-gamma in patients with chronic granulomatous disease--European follow up study. **Eur J Pediatr** 154: 295-8, 1995.
- WINIECKA, W., ZOCH-ZWIERZ, W., WASILEWSKA, A., WIERCINSKI, R., TOMASZEWSKA, B., KORZENIECKA-KOZERSKA, A. and POROWSKI, T. Evaluation of bladder instability in children with recurrent urinary tract infections. **Med Sci Monit** 8: CR19-23, 2002.
- WINKELSTEIN, J. A., MARINO, M. C., JOHNSTON, R. B., JR., BOYLE, J., CURNUTTE, J., GALLIN, J. I., MALECH, H. L., HOLLAND, S. M., OCHS, H., QUIE, P., BUCKLEY, R. H., FOSTER, C. B., CHANOCK, S. J. and DICKLER, H. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. **Medicine (Baltimore)** 79: 155-69, 2000.
- WOODMAN, R. C., NEWBURGER, P. E., ANKLESARIA, P., ERICKSON, R. W., RAE, J., COHEN, M. S. and CURNUTTE, J. T. A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells. **Blood** 85: 231-41, 1995.

YEGANEH, M., HEIDARZADE, M., POURPAK, Z., PARVANEH, N., REZAEI, N., GHARAGOZLOU, M., MOVAHEDI, M., SHABESTARI, M. S., MAMISHI, S., AGHAMOHAMMADI, A. and MOIN, M. Severe combined immunodeficiency: A cohort of 40 patients. **Pediatr Allergy Immunol**, 2007.

Anexo 1

Estudo de pacientes com suspeita de Imunodeficiência Primária Fagocitária

Laboratório de Biología Molecular - CIPED

Médico responsável pelo paciente:									
e-mail:		Telefone:							
Endereço:									
País:									
Nome do paciente:									
País:									
Grupo étnico:									
Referência do artigo onde foi publicado:									
H.C.	Tel:	Data de nascimento:	Sexo Masculino ☐ Feminino ☐	Idade - Diagnóstico meses					
Consanguinidade Sim ☐ Não ☐ Tipo		Nº. Gestações: NE* ☐	N. filhos: Masc Fem NE* ☐	Filos sadios: Sim ☐ Não ☐ Infec.repet.: Sim ☐ Não ☐ Óbito filhos: Sim ☐ Não ☐					
Antecedentes Familiares									
Óbitos por infecção Sim ☐ Não ☐		Parentesco Idade de óbito	Dx IDP Sim ☐ Não ☐ CGD Sim ☐ Não ☐ Outra						
<table border="0"> <tr> <td>Vacinas</td> <td>BCG Sim ☐ Não ☐ NE ☐</td> <td>Idade de aplicação Dias ☐ Meses ☐</td> <td>Reação adversa Sim ☐ Não ☐</td> <td> Adenomegalias próximas ao local da vacina ☐ BCG disseminada ☐ localização: Tratamento: Recidiva: Nº de episódios: </td> </tr> </table>					Vacinas	BCG Sim ☐ Não ☐ NE ☐	Idade de aplicação Dias ☐ Meses ☐	Reação adversa Sim ☐ Não ☐	Adenomegalias próximas ao local da vacina ☐ BCG disseminada ☐ localização: Tratamento: Recidiva: Nº de episódios:
Vacinas	BCG Sim ☐ Não ☐ NE ☐	Idade de aplicação Dias ☐ Meses ☐	Reação adversa Sim ☐ Não ☐	Adenomegalias próximas ao local da vacina ☐ BCG disseminada ☐ localização: Tratamento: Recidiva: Nº de episódios:					
Reação adversa a outras vacinas? Sim ☐ Não ☐			Especificar: vacina manifestação						
DNPM	Adequado Sim ☐ Não ☐ NE ☐		Detalhar se não é adequado						
Peso: (percentil)		Altura: (percentil)							
		Per. craniano: (percentil)							
1ª manifestação clínica		Motivo de Estudo de IDP							
Idade meses Ag. etiológico identificado:		Infec. Repetição Sim ☐ Não ☐							
Internação: Sim ☐ Não ☐ Sim ☐ Não ☐		Manifest. Grave Sim ☐ Não ☐							

NE ☐		Qual: Local:		História Familiar Sim ☐ Não ☐ Outro ☐ . Especificar:	
Manifestações	N. de episódios	N. de internações	Microorganismo Isolado		Localização
1 Otite					
2 Pneumonia					
3 Pneumonia / DP					
3 Amigdalite					
4 Linfadenite					
5 ITU					
6 Meningite					
7 Artrite					
8 Osteomielite					
9 Diarreia					
10 Infecção de Pele Especificar:					
11 Artrite					
12 Bacteremia					
13 Fungemia					
14 Outras					
Infecção micobacteriana (Não BCG) especificar localização e microrganismo:					
Granulomas Sim ☐ Não ☐	Nº episódios	Localização Traco Gastro- Intestinal ☐ Urinario ☐		Cardíaco ☐ Outra:	Microorg. Isolado Sim ☐ Não ☐ Qual:
Exames Laboratório – início da investigação					
HMG	Hb	Leuco	NT	LT	PLQ
Imunoglobulinas	IgG	IgM	IgA	IgE	
Complemento	C3	C4	CH50		
Outros componentes:					
HIV	Reag ☐ Não-reag ☐ Não realizado ☐				
Quimiotaxia			Monócitos	PMN (granulócitos)	
	Mig. Espontanea				
	Mig estim. NI				
	Mig. estim. pcte				
Superóxido	Monócitos		PMN	NBT	

Espontâneo			Repouso	Estimulado
Estimulado				
Estímulo utilizado para Superóxido:			Estímulo utilizado para NBT:	
DHR	Normal ☐ Não realizado ☐	Alterada ☐ Porcentagem: (ou intensidade de fluorescência)	Mulher portadora ☐ Parentesco	Estímulo utilizado para DHR:
Espectrofotometria para quantificação do citocromo b558:				
Tipo de células				
Western blot (especificar quais proteínas foram testadas e em quais tipos celulares):				
Diagnóstico molecular: gene: CYBB ☐ CYBA ☐ NCF1 ☐ NCF2 ☐ mutação: proteína: expressão Sim ☐ Não ☐				
Biopsias:				
Tratamento:				
IFNγ Sim ☐ Não ☐ Atual ☐ previo ☐ Idade início tto: meses duração do tto: meses dose: freq: reação adversa: Sim ☐ Não ☐ especificar: conduta na reação adversa:			Antifúngico Sim ☐ Não ☐ Nome do fármaco: Atual ☐ previo ☐ Idade início tto: meses duração do tto: meses dose: freq: reação adversa: Sim ☐ Não ☐ especificar: conduta na reação adversa:	
Antibiótico Sim ☐ Não ☐ Nome do fármaco: Atual ☐ previo ☐ Idade início tto: meses duração do tto: meses dose: freq: reações adversas: Sim ☐ Não ☐ especificar: conduta na reação adversa:			Corticosteroides Sim ☐ Não ☐ Nome do fármaco: Atual ☐ previo ☐ Idade início tto: meses duração do tto: meses motivo do tto: dose: freq: reações adversas: Sim ☐ Não ☐ especificar: conduta na reação adversa:	

Transplante de médula ósea:	Sim ☐ Não ☐ Idade: meses Resultado:		
	Condição clínica pre TMO:		
	Complicação: Sim ☐ Não ☐		
	Qual:		
Óbito:	Sim ☐ Não ☐	Autopsia:	Sim ☐ Não ☐
	Idade: meses		Informe:
	Causa:		

*NE= não especificado.

Arvore genealógica. Se o paciente tem outros irmãos afetados, por favor preencha outra planilha para este individuo.