

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

LAÍS COUTO E LIMA ALENCAR

**Avaliação imunológica – fenotípica, funcional e genética – de paciente com
Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC)**

São Luís
2018

LAÍS COUTO E LIMA ALENCAR

**Avaliação imunológica – fenotípica, funcional e genética – de paciente com
Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC)**

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira

São Luís
2018

LAÍS COUTO E LIMA ALENCAR

**Avaliação imunológica – fenotípica, funcional e genética – de paciente com
Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC)**

Monografia apresentada ao curso de
Farmácia da Universidade Federal
do Maranhão, para obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: ___/___/___

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira

Instituição: DEPAT – UFMA

Assinatura: _____

2º Avaliador: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

3º Avaliador: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico aos meus pais e minhas irmãs, por todo o amor, apoio e carinho. Também a todos os mestres que colaboraram para minha formação acadêmica.

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todos os esforços dedicados a minha formação não só como farmacêutica, mas como pessoa. Seu amor imensurável é a luz que guia e ilumina meus dias.

À minha irmã, Camila, por estar presente em todas as horas, enfrentando comigo os momentos mais difíceis e compartilhando as maiores alegrias.

Aos meus familiares, em especial minhas avós, Tia Nana e Tia Cianinha. Nos últimos cinco anos, foram pessoas que me ajudaram constantemente, pelas quais tenho imensa gratidão.

Ao meu orientador, pela paciência e atenção ao longo do tempo que trabalhamos juntos. Sou muito grata por tudo, principalmente pelas oportunidades e ensinamentos.

Ao Grupo de Pesquisa em Imunologia Humana, em especial Lillian, Kelly, Carla, Annie e Éder, pela colaboração na execução do trabalho e amizade construída.

Aos demais integrantes do Laboratório de Imunofisiologia, sempre colaborando de todas as maneiras possíveis para execução dos trabalhos de pesquisa e alegrias do convívio diário.

Aos amigos que me acompanham desde o ensino médio, em especial os que fazem parte do "CMD". Foi bom chegar até aqui na sua companhia.

Aos amigos da minha turma de graduação, em especial Gabriela e Ivana, que estiveram comigo desde o início, participando dos meus melhores momentos dentro e fora da universidade.

À da Liga de Hematologia, pelo que construímos nos últimos anos e amizades cultivadas. Em especial, ao professor Toni, nosso mentor e amigo.

Aos professores do Departamento de Farmácia, pelo exemplo profissional inspirador.

*“Tudo vale a pena se a alma
não é pequena.”*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

O quadro clínico definido como Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC) pode ser uma manifestação de Imunodeficiência Primária (IDP), sendo caracterizada por infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida spp.* Considerando a necessidade do desenvolvimento de protocolos para diagnóstico de IDPs e caracterização de suas principais manifestações, o presente trabalho visou a determinação do perfil imunogenético de paciente com suspeita de CMC associada a erros inatos da imunidade. O objetivo principal consistiu na realização de diagnóstico imunológico de paciente com quadro clínico sugestivo de Imunodeficiência Primária. Realizamos o estudo de paciente selecionado por conveniência no ambulatório de Imunologia Pediátrica do Hospital Universitário Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão, na cidade de São Luís. A determinação do perfil de manifestações clínicas foi realizada através de análise de prontuário e exames realizados no hospital, enquanto a triagem imunológica para IDP consistiu na avaliação fenotípica, funcional e genética de leucócitos do sangue. A partir dos indicadores avaliados, conseguimos confirmar o diagnóstico de CMC pela persistência dos sintomas e associação a espécie rara identificada, *C. lusitaniae*. O paciente possuía antecedentes patológicos contendo diversas infecções bacterianas e Tuberculose (TB). Foram encontrados desvios fenotípicos funcionais afetando a resposta imune inata e adaptativa. Apesar das contagens normais de leucócitos no hemograma, encontramos reduzida expressão de mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos e monócitos, demonstrando provável falha funcional. Já os linfócitos, que estavam dentro do intervalo de normalidade no hemograma, as avaliações fenotípicas evidenciaram contagens de populações específicas de linfócitos T e B abaixo da normalidade. Essas células também demonstraram falha na proliferação, principalmente células T CD4+, frente aos estímulos utilizados. Através de análise genética, identificamos uma nova mutação *missense* no gene *STAT1* (c.1151A>G). Tal alteração resulta em troca de uma lisina por um ácido glutâmico (p.Lys652Glu, K652E) no domínio SH2 da proteína. Com base nos resultados obtidos, conseguimos sugerir padrões de manifestação clínicas e laboratoriais relacionadas à mutação encontrada, relacionada a defeitos em fagócitos e linfócitos T, relacionados a infecções por micobactérias e CMC. A partir das avaliações clínicas e laboratoriais realizadas, conseguimos confirmar caso de Imunodeficiência Primária em paciente com CMC, sendo pela primeira vez, foi diagnosticado caso de CMC associado a *Candida lusitaniae* como agente etiológico. Encontramos também uma nova mutação (c.1151A>G; p.Lys652Glu, K652E) com reflexo no domínio SH2 da proteína STAT1, ocasionando falhas parciais em mecanismos que regulam porções da imunidade inata e adaptativa. Os dados gerados são relevantes para a melhoria na conscientização sobre a identificação de IDPs, acrescentando informações com potencial para auxiliar outros profissionais no desenvolvimento e melhora de investigação diagnóstica dessas doenças.

Palavras-chave: Candidíase Mucocutânea Crônica; *Candida lusitaniae*; Imunodeficiências Primárias.

ABSTRACT

The clinical picture defined as Chronic Mucocutaneous Candidiasis (CMC) may be a manifestation of Primary Immunodeficiency (PID), being characterized by fungal infections caused by species of the genus *Candida* spp. Considering the need to develop protocols for the diagnosis of PIDs and characterization of its main manifestations, the present work aimed to determine the immunogenic profile of a patient with suspected CMC associated with innate errors of immunity. The main objective was to perform an immunological diagnosis of a patient with a clinical picture suggestive of Primary Immunodeficiency. We performed the study of a patient selected for convenience at the Pediatric Immunology outpatient clinic of the Maternal and Child University Hospital of the Federal University of Maranhão, in the city of São Luís. The clinical profile was determined by analyzing the charts and examinations performed at the hospital, while the immunological screening for PID consisted of the phenotypic, functional and genetic evaluation of blood leukocytes. From the indicators evaluated, we were able to confirm the diagnosis of CMC by the persistence of symptoms and the association of the rare species identified, *C. lusitanae*. The patient had a pathological history containing several bacterial infections and Tuberculosis (TB). Functional phenotypic deviations were found affecting the innate and adaptive immune response. Despite normal leukocyte counts in the hemogram, we found reduced myeloperoxidase expression (MPO) in neutrophils and monocytes, demonstrating a probable functional failure. Thus lymphocytes, which were within the range of normalcy in the hemogram, phenotypic evaluations evidenced as counts of specific populations of T and B lymphocytes below normality. Their lymphocytes These cells also demonstrated failure in proliferation, mainly CD4 + T cells, in front of the stimuli used. Through genetic analysis, we identified a new missense mutation in the STAT1 gene (c.1151A> G). Such change results in the exchange of a lysine for a glutamic acid (p.Lys652Glu, K652E) in the SH2 domain of the protein. Based on the results obtained, we were able to suggest clinical and laboratory manifestation patterns related to the mutation found, related to defects in phagocytes and T lymphocytes, related to mycobacterial and CMC infections. From the clinical and laboratory evaluations performed, we were able to confirm the case of Primary Immunodeficiency in a patient with CMC, and for the first time, a case of CMC associated with *Candida lusitanae* was diagnosed as an ethological agent. We also found a new mutation (c.1151A> G; p.Lys652Glu, K652E) with a reflection on the SH2 domain of the STAT1 protein, causing partial failures in mechanisms that regulate portions of innate and adaptive immunity. The data generated are relevant for improving awareness of the identification of PIDs, adding information with potential to assist other professionals in the development and improvement of diagnostic investigation of PID.

Keywords: Chronic Mucocutaneous Candidiasis; *Candida lusitanae*; Primary Immunodeficiencies.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Os 10 sinais de alerta de Imunodeficiências Primárias para crianças

Figura 2 – Resposta Imune a *C. albicans*

Figura 3 – Via de sinalização JAK/STAT

Figura 4 – Domínios comuns a proteínas STAT

Figura 5 – Lesões cutâneas disseminadas pelo corpo do paciente

Figura 6 – Expressão de CD66b e HLA-DR, respectivamente, em neutrófilos e monócitos

Figura 7 – Produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos e monócitos do paciente

Figura 8 – Expressão da enzima mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos e monócitos do paciente

Figura 9 – Ensaio de Linfoproliferação

Figura 10 – Paciente com Candidíase Mucocutânea Crônica apresenta nova mutação no gene *STAT1*

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1 – Classificação Fenotípica das Imunodeficiências Primárias

Quadro 2 – Painéis para imunofenotipagem de leucócitos de sangue periférico

Quadro 3 – Microrganismos isolados durante o período de internação do paciente

Tabela 1 – Características laboratoriais do paciente

Tabela 2 – Evolução dos hemogramas do paciente considerando datas próximas à coleta para análise imunológica fenotípica e funcional

Tabela 3 – Subpopulações de linfócitos do paciente

Lista de Abreviaturas e Símbolos

APC – Aloficocianina, do inglês *Allophycocyanin*

APS – Síndrome da Poliendocrinopatia do Tipo 1

AT – Ataxia Telangiectasia

BAAR – Bacilos Álcool-Ácido Resistentes

BRAGID – Grupo Brasileiro de Imunodeficiências Primárias

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

CCD – Domínio Coiled-coil, do inglês *Coiled-coil Domain*

CD – Molécula de Diferenciação, do inglês *Cluster of Differentiation*

CEGH – Centro de Estudos do Genoma Humano

CFSE – Carboxifluoresceína Succinimidil Éster, do inglês *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CMC – Candidíase Mucocutânea Crônica

CVID – Imunodeficiência Comum Variada

DBD – Domínio de Ligação ao DNA, do inglês *DNA binding domain*

DGC – Doença Granulomatosa Crônica

DHR – Dihidrorodamina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Desoxyribonucleic Acid*

DNAg – DNA Genômico

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FITC – Fluoresceína Isotiocianeto, do inglês *Fluorescein Isothiocyanate*

FSC – Dispersão Frontal, do inglês *Forward Scatter*

HBS – Antígeno de Superfície da Hepatite B

HCV – Antígeno de Superfície da Hepatite C

HIES – Síndrome de Hiper-IgE, do inglês *Hiper-IgE Syndrom*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*

HLA-DR – Antígeno Leucocitário Humano, do inglês *Human Leukocyte Antigen*

HVA – Antígeno de Superfície da Hepatite A

IDPs – Imunodeficiências Primárias

IFN – Intérferon

IL – Interleucina

JAK – Janus Kinase

LD – Domínio de Ligação a Alfa-hélice, do inglês *Alpha Helical Linker Domain*

MFI – Mediana Da Intensidade De Fluorescência, do inglês *Median Fluorescence Intensity*

MPO - Mieloperoxidase

MSMD - Susceptibilidade Mendeliana a Micobacterioses, do inglês *Mendelian Susceptibility to Mycobacteria Diseases*

NADPH – Sistema nicotinamida dinucleotídeo fostato

NE – Não Estimulado

NETs – Armadilhas Extracelulares De Neutrófilos, do inglês *Neutrophil extracellular traps*

NM – Não Marcado

NTD – Domínio N-terminal, do inglês *N-terminal domain*

PBMC – Células Mononucleares De Sangue Periférico, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PCR – Proteína C Reativa

PBS – Solução Salina Tamponada, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PE – Ficoeritina, do inglês *Phycoerythrin*

PHA – Fitohemaglutinina, do inglês *Phytohemagglutinin*

PerCP – Peridinina Clorofila-A Proteína, do inglês *Peridinin Chlorophyll-A Protein*

RCP – Reação em Cadeia da Polimerase

SFB – Soro Fetal Bovino

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SH2 – Domínio SRC Homólogo 2, do inglês *SRC Homology 2*

SSC – Dispersão Lateral, do inglês *side scatter*

STAT - Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição, do inglês *Signal transducer and activator of transcription*

TAD – Domínio de Transativação, do inglês *Transactivation Domain*

TAE – Tris-acetato EDTA

TALE – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

TB – Tuberculose

TGF – Fator de Crescimento Tumoral, do inglês *Tumor Growing Factor*

VR – Valor de Referência

SUMÁRIO

1	Introdução	15
2	Referencial Teórico	17
2.1	Resposta Imunológica.....	17
2.2	Imunodeficiências Primárias	18
2.3	Candidíase Mucocutânea Crônica	22
2.4	Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição-1 (STAT-1)	24
3	Objetivos	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	Metodologia.....	28
4.1	Delineamento do estudo	28
4.2	Coleta de dados	28
4.3	Caracterização fenotípica de leucócitos.....	29
4.4	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	31
4.5	Ensaio de Linfoproliferação.....	31
4.6	Análise Genética	32
4.6.1	Extração do DNA genômico.....	32
4.6.2	Amplificação dos éxons do STAT1	33
4.6.3	Reações de sequenciamento	33
4.7	Análise dos resultados	34
5	Resultados	35
5.1	Relato do caso e manifestações clínicas do paciente.....	35
5.2	Avaliação laboratorial e Imunofenotípica	38
5.3	Avaliação imunológica funcional	40
5.4	Análise Genética	43
6	Discussão.....	45
7	Conclusão	50
8	Considerações Finais	51

1 Introdução

As Imunodeficiências Primárias (IDPs) são distúrbios hereditários de difícil diagnóstico, associados principalmente a infecções recorrentes, mas também a alergias, autoimunidade e síndromes inflamatórias, nos primeiros anos de vida. Em decorrência da falta de conhecimento dos profissionais da saúde, muitas dessas doenças não são devidamente diagnosticadas, levando os pacientes a condições crônicas graves ou até mesmo à morte (SELEMAN et al., 2017).

Estes erros inatos da imunidade envolvem redução no número ou ausência de leucócitos, até falhas parciais ou completa deficiência funcional dessas células. Apesar de consideradas raras, sabe-se que parte significativa dos casos dessas doenças é subdiagnosticada devido à diversidade de manifestações clínicas associadas às infecções graves (BOUSFIHA et al., 2018). Após o desenvolvimento de protocolos diagnósticos adequados, a identificação de IDPs foi expandida nos últimos anos. Desta forma, essas doenças deixaram de ser consideradas raras, havendo incidência de até 1/600 nascidos vivos para casos de deficiências de anticorpos (Picard et al, 2015).

Pacientes acometidos por infecções fúngicas disseminadas, invasivas ou recorrentes possuem fatores que aumentam sua vulnerabilidade a estes patógenos. As IDPs aumentam o risco de acometimento por essas doenças por falhas em mecanismos diversos relacionados a uma gama de mutações específicas em diferentes vias da imunidade (PILMIS et al., 2016).

O quadro clínico definido como Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC) pode ser uma manifestação de IDP, sendo caracterizada por infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida spp.* Ocasionalmente lesões disseminadas que afetam pele e mucosas, manifestadas ainda nos primeiros anos de vida. Indivíduos com este tipo de infecção rara possuem defeitos na resposta imune a fungos, podendo haver desde falhas no reconhecimento de padrões moleculares até deficiências funcionais de linfócitos T (CHAMBÔ FILHO et al., 2014; OKADA et. al., 2016).

Defeitos em fatores envolvidos no desenvolvimento dos linfócitos Th17, essenciais na resposta imune a fungos, são algumas das principais deficiências que levam a maior susceptibilidade de infecções fúngicas, como a CMC. Estas células

reagem às infecções pela produção das citocinas IL-17 e IL-22, tendo sua produção controlada por fatores de transcrição genética do tipo STAT. Mutações que afetam os fatores envolvidos nessa via de resposta são algumas das principais causas conhecidas de CMC (HUPPLER, BISHU & GAFFEN et al., 2012; PLATO, HARDISON & BROWN, 2015).

Visto que as IDPs são desordens de difícil identificação e diagnóstico, torna-se necessária a expansão de centros especializados no estudo e triagem dessas doenças. No intuito de iniciar as investigações adequadas de IDPs no Maranhão, considerando a ausência de relatos identificando casos no estado, foi estabelecido o Grupo de Imunologia Humana (GPIH) da UFMA. Além de identificar as causas específicas de erros inatos da imunidade, visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes, o grupo auxilia na educação continuada de profissionais de saúde através de eventos científicos, seminários e publicações.

Considerando a necessidade do desenvolvimento de protocolos para diagnóstico de IDPs e caracterização de suas principais manifestações, o trabalho proposto visou a determinação do perfil imunogenético de paciente com suspeita de CMC associada erros inatos da imunidade.

2 Referencial Teórico

2.1 Resposta Imunológica

Responsável pela defesa do organismo contra a vasta quantidade de patógenos presentes no ambiente, o sistema imunológico é quem responde à presença desses agressores e mantém a homeostasia do corpo. Os mecanismos de estimulação dos leucócitos, células de defesa do organismo, são iniciados através do reconhecimento de padrões moleculares relacionados a danos ou patógenos por meio de receptores específicos. Sinais emitidos através de moléculas solúveis, como as citocinas e quimiocinas, induzem a migração, ativação e proliferação dessas células (IWASAKI & MEDZHITOV, 2015).

Como primeira linha de resposta do organismo, a imunidade inata é capaz de detectar quantidades limitadas de antígenos característicos de grupos de microrganismos danosos. É composta por substâncias solúveis, como as moléculas do sistema complemento, e celulares, como os granulócitos, macrófagos e células dendríticas; ambos contribuindo para resposta a infecções. Sua eficácia na eliminação de agentes infecciosos está relacionada ao reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), geralmente constituintes da estrutura celular e essenciais sobrevivência desses micróbios (SCANZANO & CONSENTINO, 2015).

A resposta adaptativa do sistema imune, composta principalmente pelos linfócitos T e B, é responsável pelo desenvolvimento da memória imunológica (MADDOF, 2015). O sistema adaptativo consegue reconhecer uma maior variedade de antígenos, além de promover uma resposta imune mais eficaz e específica, devido à produção de uma grande diversidade de citocinas imunomoduladoras, além de imunoglobulinas (KOONIN & KRUPOVIC, 2015).

Além disso, o sistema imunológico dispõe de mecanismos capazes de reconhecer antígenos próprios, controlar a resposta a infecções, assim como potencializá-la. A ação conjunta dos elementos que o compõem, sendo fatores de resposta inata ou adaptativa, resulta na eliminação efetiva dos agentes infecciosos (CHAPEL et. al., 2014).

Entre as diversas patologias que acometem o organismo humano, sabe-se que as infecções são algumas das causas de morte mais frequentes. Mesmo após o

desenvolvimento de medicamentos, medidas sanitárias e vacinas, ainda existem muitos indivíduos que sofrem agravo dessas condições devido a fatores genéticos (CASANOVA & ABEL, 2005).

Falhas na geração ou no funcionamento dos componentes do sistema imunológico são conhecidas como Imunodeficiências. Tais distúrbios podem ter origem hereditária, devido a polimorfismos e mutações genéticas, ou podem ser secundárias a terapias medicamentosas e outras doenças. Os sintomas estão relacionados a desregulações que levam à maior susceptibilidade a infecções, que podem ser graves, recorrentes ou formas atípicas de apresentação (ABBAS, 2015).

2.2 Imunodeficiências Primárias

As Imunodeficiências Primárias (IDPs) são defeitos intrínsecos dos mecanismos da imunidade inata ou adaptativa. De uma forma geral, estas patologias são consideradas raras por sua frequência. No entanto, existem mais de 300 tipos de IDPs com mutações documentadas, as quais são erros inatos da imunidade classificados pelo perfil de manifestações clínicas (Quadro 1). Podem estar associadas não somente a infecções recorrentes, como também a autoimunidade, síndromes inflamatórias e neoplasias (BOUSFIHA et al., 2018). Pode-se observar casos de IDP caracterizadas por falhas quantitativas, qualitativas ou mistas, cujos sintomas estão relacionados a desordens nos mecanismos de defesa pelos quais as linhagens celulares afetadas são responsáveis.

Quadro 1 - Classificação Fenotípica das Imunodeficiências Primárias

IDPs que afetam imunidade celular e humoral
Imunodeficiências Combinadas associadas a síndromes
Deficiência predominante de anticorpos
Doenças de imunodesregulação
Defeitos congênitos de fagócitos
Defeitos da imunidade intrínseca e inata
Desordens autoinflamatórias
Deficiência de complemento
Fenocópias de IDP

Existem defeitos congênitos de fagócitos, células importantes da resposta imune inata, os quais representam aproximadamente 10% das IDPs conhecidas. Dentre eles, a Doença Granulomatosa Crônica (DGC) é causada por mutações genéticas que comprometem a funcionalidade do sistema nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, responsável pela produção de reativos de oxigênio, encontrado na membrana plasmática e vesículas de células como neutrófilos e monócitos (RUGGERO ERRANTE, MENEZES RODRIGUES & RIBEIRO NOGUEIRA FERRAZ, 2016). Junto ao histórico clínico, o diagnóstico de DGC pode ser feito através de citometria de fluxo pelo método de dihidrorodamina (DHR), pelo método de redução de nitrobluetetrazólio ou pela dosagem de ânion superóxido por redução do citocromo c (BONILHA et al., 2010).

Deficiências de Anticorpos caracterizam-se, geralmente, por defeitos no desenvolvimento ou função de linfócitos B e falhas na atividade de linfócitos T. Desse modo percebe-se a redução ou ausência na produção de imunoglobulinas propiciando a ocorrência de infecções recorrentes. Observa-se principalmente sintomas relacionados ao trato respiratório, que podem tornar-se graves com a demora no diagnóstico (SCHUSSLER, BEASLEY & MAGLIONE, 2016). Mutações nos genes que codificam moléculas responsáveis pela co-estimulação entre linfócitos T e B, como CD40L, podem levar a falha de função de células T auxiliares e defeitos na troca de classes de anticorpos (TANGYE, et. al., 2013).

A Imunodeficiência Comum Variada (CVID) é habitualmente caracterizada por baixos níveis séricos de anticorpos IgG, IgA ou IgM, mesmo havendo a presença de células CD19+ (marcador característico de linfócitos B) (BOUSFIHA, 2018). Nela,

podem haver alterações nos genes responsáveis pela codificação de receptores proteicos que participam da ativação de linfócitos B, troca de classe de anticorpos, indução de apoptose, entre outros. Enquanto isso, as alterações de linfócitos T em CVID estão geralmente relacionadas a falhas na produção de citocinas que participam da sinalização entre células T e B (VAN SCHOUWENBURG, 2015).

Falhas na imunidade humoral também podem ocorrer como manifestações secundárias de outras síndromes que não estão inicialmente relacionadas ao sistema imunológico. Um exemplo importante é a Ataxia Telangiectasia (AT), que resulta de mutações autossômicas recessivas no gene *ATM*, responsável pela codificação de proteínas PIK-3 quinase. Tais alterações afetam mecanismos responsáveis por coordenar o ciclo celular através da fosforilação de substratos proteicos, afetando diversos sistemas (AMBROSE & GATTI, 2013). Portadores dessas variações genéticas podem ter reduzidas contagens de linfócitos ou de suas subpopulações, sendo a linfopenia TCD4⁺ a mais comum, a falhas na produção e troca de classe de anticorpos (CHOPRA et al., 2014).

O desenvolvimento de centros de diagnóstico especializados tem possibilitado o aumento da confirmação e documentação de casos de IDP, direcionando os pacientes ao tratamento adequado. Como é o caso dos “10 sinais de alerta para Imunodeficiências Primárias” para crianças e adultos elaborados pela fundação Jeffrey Modell (JMF, do inglês *Jeffrey Modell Foundation*), esses centros otimizam a identificação de IDPs pela adoção de protocolos específicos (MODELL et al., 2016).

Figura 1 – Os 10 sinais de alerta de Imunodeficiências Primárias para crianças.



Fonte: Jeffrey Modell Foundation (2018).

A partir disso pôde-se traçar o perfil epidemiológico das IDPs, que atualmente passam de 5.000 casos diagnosticados no Brasil. Na América Latina, as IDPs mais frequentemente encontradas são deficiências de anticorpos, também sendo frequentes defeitos de fagócitos, imunodeficiências combinadas e desordens autoinflamatórias (CONDINO-NETO et al., 2015).

Diversas imunodeficiências podem levar a defeitos na proliferação leucocitária, seja devido a problemas de sinalização ou maturação celular, podendo acometer diretamente determinadas linhagens. A proliferação de linfócitos pode ser monitorizada através do uso do Carboxifluoresceína Succinimidil Éster (do inglês *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*, CFSE) devido à ausência de efeitos tóxicos

da substância sobre as células e sua emissão de fluorescência, possibilitando análises por Citometria de Fluxo (AZARSIZ et al., 2018).

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) é descrita como um dos fatores determinantes para a eliminação de grande parte dos patógenos, estando envolvidas principalmente nos mecanismos de fagocitose. O ensaio de DHR é uma técnica para análise da produção de EROs realizada por meio da quantificação indireta da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela oxidação da dihidrorodamina (DHR)-123 em rodamina-123. A rodamina-123 é excitável por um comprimento de onda de 488 nm e emite uma fluorescência de 515 nm, permitindo a análise por citometria de fluxo (BUSTAMANTE et al., 2011).

Uma das análises mais importantes para caracterização das atividades celulares é a avaliação de moléculas expressas na superfície da membrana plasmática, que possuem papel essencial funções básicas dos leucócitos. A imunofenotipagem consiste na interação de anticorpos monoclonais ligados a fluoróforos que reconhecem moléculas características de determinadas populações de células ou de condições de respostas imunológicas. Através da detecção da fluorescência emitida, é possível identificar a presença de partículas especificamente ligadas aos marcadores utilizados (VAN DONGEN, 2018).

Através do uso de tecnologias específicas, com o direcionamento correto, pode-se determinar eventuais falhas em vias pertencentes ao sistema imunológico. Assim sendo, a detecção de caso de IDP torna-se necessária, em virtude de estas doenças não terem diagnóstico conclusivo na ausência de triagens adequadas. Além disso, a elucidação dos mecanismos causadores da doença contribuem para a produção acadêmica referente à área.

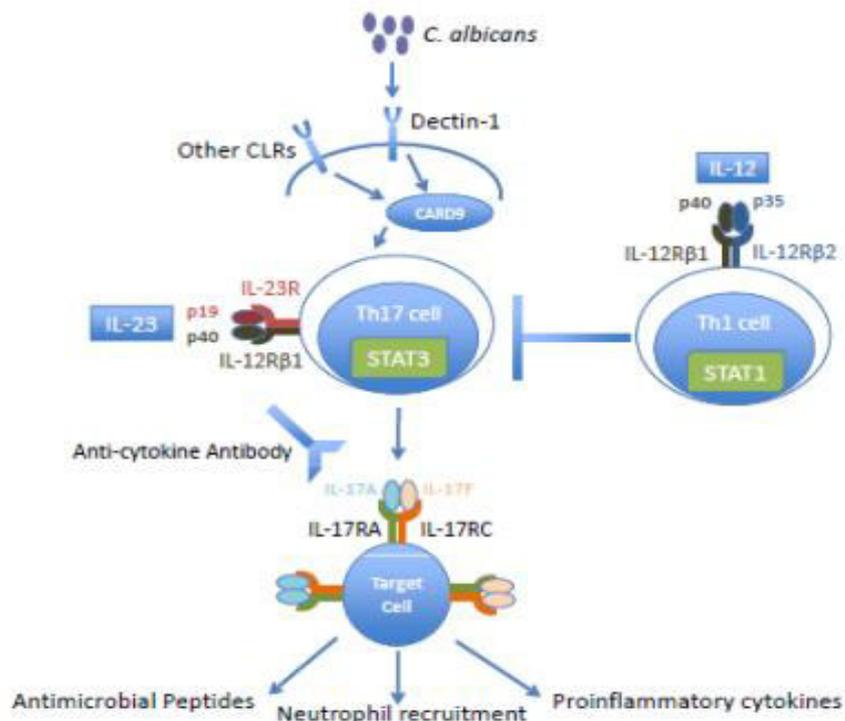
2.3. Candidíase Mucocutânea Crônica

A Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC) consiste como o tipo de infecção causada por espécies do gênero *Candida spp.*, sendo a *C. albicans* de maior relevância. Consideradas raras, manifesta-se através de lesões disseminadas nas mucosas, pele e unhas, não se tornando invasiva. Afeta indivíduos imunossuprimidos, sendo associada a indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), ou a defeitos genéticos da imunidade, incluindo autoimunidade e

imunodeficiências primárias. Quando manifestada ainda nos primeiros anos de vida, maiores as possibilidades de agravamento da doença (DE MORAES VASCONCELOS et al., 2001; MOORHOUSE et al., 2016; PUEL et al., 2012; SASIDHARANPILLAI et al., 2018).

Os principais mecanismos afetados em situações onde há susceptibilidade a CMC estão relacionadas a vias de resposta imune que envolvem as linhagens de linfócitos Th17, importantes na defesa adaptativa do organismo contra fungos e bacterianas. Uma vez reconhecidos os PAMPs característicos do gênero *Candida* por células da imunidade inata através de receptores do tipo Toll e Dectina, inicia-se a produção de fatores solúveis para o recrutamento de fagócitos. Quanto à resposta adaptativa, a produção de células de memória é realizada através da apresentação de antígenos pelas células dendríticas aos linfócitos T auxiliares, que se diferenciam nas linhagens Th17 na presença de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-23 e TGF- β . Uma vez ativadas, essas células produzem IL-22/IL-17, que reforçam a atividade fungicida pela produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos ao sítio infeccioso. (DAVIDSON, NETEA & KULLBERG, 2018; PATEL & KUCHROO, 2015).

Figura 2 – Resposta Imune a *C. albicans*.

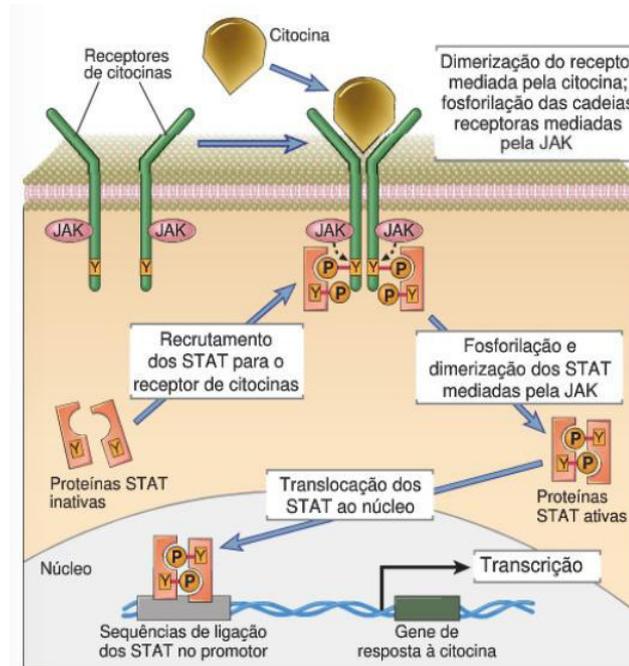


Fonte: Huppler et al. (2012).

Na síndrome conhecida como Poliendocrinopatia do Tipo 1 (APS-1), defeitos na regulação tímica de linfócitos auto reativos resulta na formação de anticorpos contra citocinas IL-17, manifestando CMC. Deficiências na produção dessas citocinas e mutações em seus receptores também levam a alterações na resposta Th17. Alterações genéticas nos fatores de transcrição que coordenam a função dessas células levam a CMC. Nos casos de síndrome de Hiper-IgE (HIES), ocorre por falhas no fator STAT-3, que regula positivamente esses linfócitos, enquanto mutações de ganho de função em STAT-1 os inibem pela produção de citocinas regulatórias como IFN- γ , IFN- α/β e IL-27 (HUPPLER et al., 2015).

2.4. Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição-1 (STAT-1)

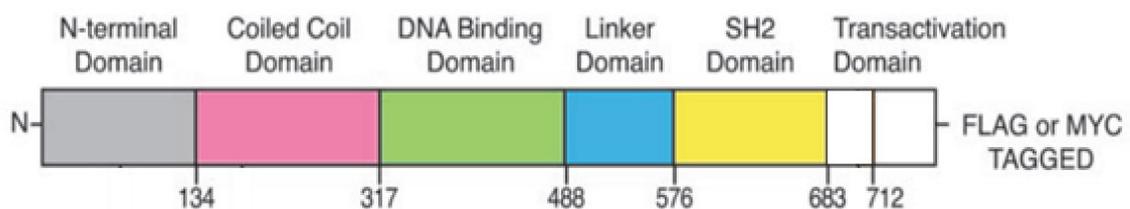
Associadas a famílias receptores transmembranares dos tipo I e II, existem complexos protéicos responsáveis pela regulação o processo transcricional celular através de sinalização intracelulares. Proteínas janus kinase (JAK) associadas a esses receptores, após o reconhecimento de citocinas específicas, mudam sua conformação e agem fosforilando resíduos de tirosina intracelulares. Por sua vez, as JAK também ativam monômeros de transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT) por fosforilação, que dimerizam e são transferidas para o núcleo, onde regulam a transcrição de genes. Apesar de agirem por mecanismos gerais, as diferentes combinações entre citocinas e os tipos de JAK/STAT contribuem para especificidade de diversas vias imunológicas. (MAUDE et al., 2015).

Figura 3 – Via de sinalização JAK/STAT

Fonte: Abbas, Lichtman & Pillai. (2015)

Nas células Th17, responsáveis pela resposta imune a fungos, a STAT-3 estimula o fator de transcrição ROR γ T, específico para estas células na produção de IL-17. Enquanto isso, o fator STAT-1 antagoniza a função dessas células pela sua participação na produção de IL-27 por células T regulatórias, que controlam sua maturação e proliferação Th17 pela inibição de ROR γ T. (ASTRY, VENKATESHA & MOUDGIL, 2015; SEHRAWAT & ROUSE, 2017; SEIF et al, 2017).

As proteínas STAT possuem 6 domínios conhecidos relacionados às interações moleculares específicas que acontecem nessas regiões, sendo responsáveis por particularidades no seu funcionamento (SEIF et al, 2017).

Figura 4 – Domínios comuns a proteínas STAT

Fonte: Zhong et al. (2005)

Mutações que resultam na modificações da composição dessas regiões são capazes de levar à desregulação relacionada ao sítio afetado. Alguns exemplos são as mutações de ganho de função no gene STAT-1, que alteram os domínios de fosforilação da proteína e, conseqüentemente, elevam os efeitos de sua ativação. Resultam no impedimento da resposta Th17, associadas principalmente ao fenótipo de CMC (SOBH et al., 2016).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Realizar diagnóstico imunológico de paciente com quadro clínico sugestivo de Imunodeficiência Primária.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente as populações de leucócitos do sangue periférico do paciente;
- Avaliar possíveis falhas funcionais celulares relacionadas ao quadro clínico apresentado pelo paciente;
- Confirmar o diagnóstico de Imunodeficiência Primária, associando os achados laboratoriais às manifestações clínicas apresentadas pelo paciente.

4 Metodologia

4.1 Delineamento do estudo

O trabalho realizado é composto por duas etapas relevantes, em relação à classificação do tipo de pesquisa. A primeira, referente à coleta de dados clínicos do paciente, consiste em um estudo observacional, descritivo, prospectivo, exploratório, documental e longitudinal. A segunda etapa, referente às análises imunogenéticas do paciente, consiste em um estudo experimental, analítico, explicativo, de laboratório e transversal.

4.2 Coleta de dados

O presente estudo consiste em um relato de caso em paciente pediátrico com quadro clínico sugestivo de Imunodeficiência Primária (IDP). Foi realizada seleção do paciente por conveniência a partir de encaminhamento ao ambulatório de Imunologia Pediátrica do Hospital Universitário Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão, na cidade de São Luís. Dados clínicos, considerando antecedentes patológicos e anamnese e laboratoriais, incluindo hemograma, marcadores inflamatórios, sorologias para antígenos virais e dosagens de imunoglobulinas, assim como o exame físico pela avaliação dos aparelhos respiratório e osteoaurículas, pele, cabeça, pescoço, abdome, membros, juntamente ao desenvolvimento ponderoestrutural e neuropsicomotor, avaliação de histórico familiar e análise de prontuário motivaram a inclusão do paciente no estudo de IDP. Para tanto, seguimos os protocolos estabelecidos pelo Grupo Brasileiro de Imunodeficiências (BRAGID) referentes aos sinais suspeitos de IDP (MODELL et al., 2016), e a não positividade para o teste rápido anti-HIV. Além dos dados clínicos, foram coletadas amostras de sangue periférico do paciente para avaliação imunológica funcional e análise genética do paciente. Estes ensaios são descritos nas seções subsequentes.

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão, parecer nº 2.639.669, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 69633414.0.0000.5087, obedecendo-

se a todas as recomendações da Resolução 466/12 do CNS. A concordância com o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) assegura o sigilo dos dados coletados e a utilização de tais informações única e exclusivamente para fins científicos, preservando, integralmente, o anonimato do paciente. Além disso, o convite ao paciente foi acompanhado da apresentação e justificativa do trabalho, com o conteúdo destes informados também verbalmente. O TALE foi emitido e assinado em duas vias pelo responsável legal pelo paciente e pesquisador, assegurando a preservação da identidade e o direito do mesmo se desvincular da pesquisa a qualquer momento, sem ônus de qualquer natureza (APÊNDICE 1). A amostra de sangue para nosso estudo foi coletada juntamente a outras para procedimentos já preconizados para o acompanhamento do paciente. A mesma foi realizada por profissionais experientes, em ambiente hospitalar controlado e com todos os recursos para intervenções necessárias. Dessa forma, o paciente não foi exposto a quaisquer riscos. Ainda, é importante expressar que foi realizada obtenção de amostra de sangue de voluntário sadio, sem doença infectocontagiosa ou congênita diagnosticada até o momento da coleta, sob os mesmo termos éticos que o paciente. Este foi empregado como controle experimental dos protocolos descritos a seguir.

4.3 Caracterização fenotípica de leucócitos

Avaliamos a expressão – presença ou não, e nível – de marcadores celulares característicos da identidade dos leucócitos e sua ativação. Para cada molécula observada, utilizamos um anticorpo monoclonal específico marcado com fluorocromo, o que possibilitou o emprego da técnica de citometria de fluxo para análise. Foram utilizados marcadores de identidade de linfócitos T (CD3, CD4, CD8), linfócitos B (CD19), monócitos (CD14) e neutrófilos (CD15), bem como para moléculas relacionadas a seu estado de ativação (CD69, CD66b, CD25, MPO e HLA-DR). Todos os anticorpos foram obtidos da empresa BD Biosciences (San Jose, Calif, EUA).

Os leucócitos totais do paciente e indivíduo controle foram obtidos à partir do sangue periférico (100 μL , cerca de $0,5-1 \times 10^6$ células, por tubo de citometria – tubos de poliestireno de 5mL com fundo arredondado). Os eritrócitos foram eliminados através de lise com 2mL de tampão específico (RBC Lysis Solution,

QIAGEN), seguindo as especificações do fabricante. Após a lise das hemácias, os leucócitos foram incubados com solução salina tamponada (PBS; do inglês, *phosphate buffered saline*) contendo 10% de soro humano AB e 2% de soro fetal bovino (SFB), durante 10 minutos, para evitar ligações não específicas. Após o “bloqueio”, a cada tubo foi adicionado um conjunto de anticorpos (de forma que as fluorescências não interferissem na análise) (Quadro 2), sendo incubados por 30 minutos, a 4°C, em ambiente escuro. As células foram então lavadas duas vezes em PBS contendo 2% de SFB, recolhidas em tubos e fixadas em PBS contendo paraformaldeído (1%) para leitura no citômetro de fluxo FACS Calibur® (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, EUA). Para analisar cada população celular, iniciamos a aquisição dos dados de 10000 eventos através de *gates* baseados no tamanho (FSC, do inglês *forward scatter*) e complexidade (SSC, do inglês *side scatter*) correspondentes às células de interesse. Os dados obtidos foram analisados usando o software FlowJo (Treestar Inc., Ashlan, OR, EUA). Para cada ensaio foi calculada a mediana da intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*).

Quadro 2 - Painéis para imunofenotipagem de leucócitos de sangue periférico

	FL-1 (FITC)	FL-2 (PE)	FL-3 (PerCP, PerCP- Cy™5.5)	FL-4 (APC)
Painel 1	CD3	CD4	CD8	-
Painel 2	CD3	-	CD19	-
Painel 3	CD14	MPO	-	HLA
Painel 4	CD15	MPO	CD66b	-

FL-1/4: canais ou parâmetros de fluorescência; FITC: fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin; PerCP: peridinin chlorophyll-A protein; PerCP-Cy™5.5: peridinin chlorophyll-A protein coupled to coupled to cyanine dye Cy™5.5; APC: allophycocyanin.

4.4 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A avaliação da explosão respiratória (*burst oxidativo*) foi realizada conforme previamente descrito (Bustamante et al., 2011). Para tanto, 100µL de sangue foram estimulados com forbol-12-meristato-13-acetato (PMA; do inglês *phorbol 12-myristate 13-acetate*; 50nM) ou *C. albicans* (2:1, fungos : fagócitos), além de amostras de 100µL de sangue que permaneceram não estimuladas. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora. Ao término deste período, adicionamos 300 ng/mL de dihidrorodamina (DHR) em cada microtubo, exceto ao branco da reação, e as amostras foram incubadas por 10 minutos à 37 °C. As amostras foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL com fundo redondo, lisadas com tampão de lise de hemácias conforme descrito acima (seção 4.2), seguido por 1 lavagem com 500 µL de PBS. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e ao tubo contendo o precipitado de células foram adicionados 400 µL de PBS contendo 1% de paraformaldeído. As amostras foram analisadas em citômetro FACS Calibur®. A região de granulócitos e monócitos foi determinada usando os parâmetros FSC e SSC, sendo coletados dados de 10000 e 5000 eventos. Fizemos a análise dos dados no software FlowJo. A partir dessa análise obtivemos a porcentagem da população celular produtora de H₂O₂ e uma análise semiquantitativa desse reativo produzida (sugerida pela MFI).

4.5 Ensaio de Linfoproliferação

Para esta avaliação, parte do sangue coletado (8mL) foi diluído volume/volume em PBS estéril, sendo adicionados vagarosamente em tubo cônico contendo 10 mL de Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). Este gradiente foi centrifugado e a interface contendo a camada de células mononucleares de sangue periférico (PBMC; do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) foi coletada, as células transferidas para novos tubos cônicos e lavadas duas vezes com PBS para retirada do excesso de Ficoll® Paque. As PBMC foram quantificadas em câmara hemocitométrica, sendo a viabilidade celular verificada pela utilização de azul de trypan 0,4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

Amostras de 2×10^6 PBMC foram distribuídas em placas de 24 poços e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C por 2 horas para aderência dos monócitos às placas. O sobrenadante das culturas, contendo linfócitos não-aderentes, foi separado para o ensaio em questão. Os linfócitos foram cultivados durante 3 dias estimulados com fitohemaglutinina (PHA, do inglês *Phytohemagglutinin*; BD Horizon™) ou PMA (50nM) juntamente com ionóforo de cálcio (ionomicina, 2 µg/mL) ou com *C. albicans* juntamente com monócitos (2:1:1) em volume final de 300 µL de meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino. Um grupo de linfócitos sem estímulos foi utilizado como parâmetro de comparação. Antes de serem colocados em cultura, os linfócitos foram marcados com 5,6-carboxifluoresceína diacetat succinimidil éster (CFSE; 5 mM) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Após os três dias, a proliferação dos linfócitos foi analisada por citometria de fluxo. Imediatamente antes da citometria de fluxo, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4-PE, anti-CD8-PE e anti-CD25-PE-Cy™5.5 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) durante 30 minutos à 4 °C, lavadas 2 vezes com 500 µL de PBS e ressuspendidas em PBS contendo 1% de paraformaldeído. Foram coletados 10000 eventos em cada amostra para verificação do perfil de linfoproliferação a partir da detecção da fluorescência emitida pela CFSE através da citometria de fluxo.

4.6 Análise Genética

4.6.1 Extração do DNA genômico

Para identificarmos o defeito genético do paciente, o DNA genômico (DNAg) foi extraído utilizando o kit All Prep DNA/RNA (QIAGEN), conforme instruções do fabricante. A quantidade e qualidade do DNAg foram aferidas espectrofotometricamente nos comprimentos de onda de 280 nm e 260 nm, utilizando o espectrofotômetro Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Após a leitura no espectrofotômetro, a integridade do DNAg foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) corado com Brometo de Etídio (Sigma-Aldrich), observado em transluminador UV e os produtos gerados

comparados ao padrão de massa molecular High DNA Mass Ladder (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA).

4.6.2 Amplificação dos éxons do *STAT1*

A amplificação e o sequenciamento do gene *STAT1* foram realizados em colaboração com o Laboratório de Imunologia Humana da USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Antonio Condino Neto. Os 22 éxons do gene foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (RCP), conforme previamente descrito (Seyama et al., 1998). Os produtos amplificados foram analisados após corrida eletroforética em gel de agarose a 2,5% em tampão TAE, corados com Brometo de Etídio, e os produtos gerados foram comparados ao padrão de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Life Technologies).

4.6.3 Reações de sequenciamento

Para identificação das mutações no *STAT1*, a amostra de DNAg, após ser amplificada, foi submetidas a reações de sequenciamento genético. Para tanto, os produtos de PCR foram purificados com o Kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) conforme as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) da Universidade de São Paulo com o kit DYEnamic ET Dye Terminator utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados de registros de mutações The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) e Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/central-mutation-snp-databases>). Para verificarmos se a nova mutação não correspondia a polimorfismo, a mutação identificada foi avaliada utilizando o programa MutationTaster (Schwarz et al., 2010). Além disso, as sequências foram comparadas a sequências de DNAg de 1000 indivíduos controles saudáveis (banco de dados do CEGH-USP), bem como aos dados disponibilizados

por Clinical Genomic Database (<https://research.nhgri.nih.gov/CGD/>) e Public Health Genomics (<https://www.cdc.gov/genomics/default.htm>).

4.7 Análise dos resultados

Os dados coletados, quando possível (e.g. hemograma) foram comparados a valores de referência bem estabelecidos na literatura. Para testes específicos de função imunológica, para os quais ainda não existem valores de referência, utilizamos uma amostra de indivíduo sadio para controle do experimento e parâmetro de comparação com os dados do paciente. Foram realizados experimentos únicos em triplicata. Os dados foram plotados no programa Excel (Microsoft, Redmond, Washington, EUA) para construção das tabelas, e os gráficos foram preparados no software Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 Resultados

5.1 Relato do caso e manifestações clínicas do paciente

Paciente do sexo masculino, natural da cidade de Codó-MA, com 2 anos e 1 mês. Apresentava histórico de lesões cutâneas desde o sétimo mês de vida, coincidindo com reação vacinal à BCG, persistindo até 1 ano. Houve surgimento de lesões pápulo-eritematosas e pruriginosas na região cervical e no colo, tendo sido parcialmente tratadas com pomada de princípio ativo não relatado pelos pais. Aos 18 meses suas lesões retornaram, desta vez com disseminação para a face e aspecto coalescente formando crostas, amenizadas após uso de cetoconazol. Houve progressão de novas lesões para regiões inguinal e ungueal aos 1 ano e 7 meses de vida, o que levou a internação prévia no interior do estado, de onde foi encaminhado para os serviços do Hospital Universitário Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão. Não foi constatada consanguinidade entre os progenitores, assim como histórico familiar de imunodeficiência diagnosticada ou manifestações clínicas semelhantes. Seu histórico clínico apresenta quadros respiratórios, incluindo infecções das vias aéreas superiores, asma e pneumonias, sendo a primeira aos 45 dias de vida. Infecção urinária e piodermite levaram-no a uma internação aos 2 meses, sendo constatada perda ponderal. Seus antecedentes patológicos também incluem antibioticoterapia com oxacilina endovenosa e azitromicina.

Ao exame físico no serviço do Hospital Universitário Materno Infantil, o paciente esteve distrófico, apático, com múltiplas lesões cutâneas e cicatriz de BCG. Foram constatados atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hepatomegalia e linfonodos presentes, além da constatação de atraso na vacinação e alimentação inadequada. Além de lesões dos tipos crostosas, pápulo-eritematosas, púrpura coalescentes e descamativas nas unhas, pele e couro cabeludo, sinais de candidíase oral estiveram evidentes (Figura 2). Com a investigação microbiológica a partir do raspado das lesões, foi observado a presença de bactérias gram-positivas, leveduras e pseudo-hifas da espécie *Candida lusitanae*, considerada rara na prática clínica (Quadro 3).

Quadro 3 – Microrganismos isolados durante o período de internação do paciente

Agentes Etiológicos	Origem
<i>Candida albicans</i>	Raspado de lesão crostosa
<i>Candida lusitanae</i>	Raspado de lesão crostosa
Bacilo de Koch (BAAR)	Secreção traqueal
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Swab anal
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Swab nasal
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hemocultura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Urocultura

BAAR – Bacilos Álcool-ácido Resistentes.

Considerando a extensão e persistência dos sintomas, foi estabelecido o diagnóstico clínico de Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC), cujo tratamento sugerido foi administração de triazol (itraconazol), sendo suspensa a administração de Nistatina por via tópica (Figura 1). Durante a internação, que teve duração de 49 dias, o paciente evoluiu com hepatite medicamentosa, infecção do trato urinário, pneumonia de provável origem fúngica, calázio e impetigo bolhoso. Foi tratado com os antimicrobianos e recebeu alta com lesões cutâneas em cicatrização. Nesse período, foram coletadas amostras de sangue para avaliações imunofenotípicas, imunológicas funcionais e análise genética.

Figura 5 – Lesões cutâneas disseminadas pelo corpo do paciente.



(A) Lesões eritemato-vesicobolhosas com bordas elevadas em crescimento centrífugo distribuídas pelo tronco; (B) Crostas acastanhadas hipertróficas aderentes na face, couro cabeludo e pavilhões auriculares; (C) Lesões dos membros superiores de aspecto eritematoso; (D) Lesões nas unhas.

O paciente voltou ao hospital 5 meses depois devido ao reaparecimento das manifestações cutâneas. Ressalta-se que o mesmo não compareceu ao retorno previamente marcado para monitorização. Estava febril, desnutrido, novamente com monília e lesões crostosas pelo corpo. Iniciou-se nova internação para continuidade da investigação para IDP e tratamento com itraconazol, oxacilina e nistatina oral. Evoluiu com sepse, infecção urinária e diagnóstico clínico-laboratorial de tuberculose, iniciando tratamento com tuberculostáticos.

Em decorrência de complicações, foi encaminhado à UTI Pediátrica do Hospital em estado gravíssimo, oligoanúrico, havendo agravamento do quadro por insuficiência respiratória e perda de função renal, progredindo sem resposta a tratamentos dialíticos. Apresentou sangramento nas vias aéreas, trato oral e gástrico, ficando hipotenso e bradicárdico, em uso de drogas vasoativas. Em decorrência das complicações causadas pelas infecções, principalmente devido à tuberculose, o paciente veio a óbito aos 3 anos e 3 meses.

5.2 Avaliação laboratorial e Imunofenotípica

A investigação sorológica para antígenos virais apresentou resultados não-reagentes para contato com os antígenos testados, HIV, HBS, HVA e HCV. Exames complementares, também realizados no serviço onde o paciente esteve internado, mostraram marcadores inflamatórios, PCR, C3 e C4, elevados. Anticorpos IgG e IgA também foram encontrados em títulos aumentados; ao passo que os valores de IgE estiveram dentro do intervalo de normalidade (Tabela 1).

Tabela 1 – Características laboratoriais do paciente.

Marcadores Inflamatórios (mg/dL)			Anticorpos (mg/dL)			Sorologias	
		VR			VR		
PCR	24,99	0,01-0,28	IgG	1.692	453-916	Anti-HIV I e II	NR
C3	266,8	90-180	IgA	144	20-100	Anti-HBS	NR
C4	59,1	10-40	IgE	20	0-24	Anti-HVA	NR
						Anti-HCV	NR
						Anti-HCV	NR

NR: Não Reagente; VR: Valor de Referência; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HBS: antígeno de superfície da hepatite B; HVA: antígeno de superfície da hepatite A; HCV: antígeno de superfície da hepatite C; PCR: proteína C reativa.

Nos hemogramas que precederam a triagem imunológica específica (02/10 e 27/10/2017), observou-se alterações, como aumento do número total de leucócitos e no número de neutrófilos (Tabela 2). Suas populações leucocitárias estiveram

normalizadas no período da coleta de sangue para a triagem imunológica específica realizada no presente estudo.

Tabela 2 - Evolução dos hemogramas do paciente considerando datas próximas à coleta para análise imunológica fenotípica e funcional

Leucograma	Resultado de 02/10/17	Resultado de 27/10/17	Resultado de 11/11/17	Valor de Referência¹
Leucócitos Totais	13.000/mm ³	18.400/mm ³	8.410/mm ³	5.000-12.000/mm ³
Neutrófilos	58% (7.540/mm ³)	73%(13.432/ mm ³)	58% (4.877/mm ³)	38-74% (1.444-8.140/mm ³)
Segmentados	58% (7.540/mm ³)	73%(13.432/ mm ³)	58% (4.877/mm ³)	37-70% (14-7.700/mm ³)
Linfócitos Típicos	24% (3.120/mm ³)	12% (2.208/mm ³)	29% (2.441/mm ³)	18-48% (684-5.280/mm ³)
Monócitos	4% (520/mm ³)	14% (2.576/mm ³)	9% (756/mm ³)	1-12% (38-1.320/mm ³)
Eosinófilos	14% (1.820/mm ³)	0% (0/mm ³)	3% (252/mm ³)	0-6% (0-660/mm ³)
Basófilos	0% (0/mm ³)	1% (184/mm ³)	1% (84/mm ³)	0-3% (0-330/mm ³)

¹ OLIVEIRA, 2007.

Sendo considerados os valores de aceitação, as subpopulações de linfócitos estiveram dentro da normalidade. A análise específica de subpopulações de linfócitos mostrou que todas (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ e CD19+) estavam no percentil 10 para a idade do paciente (Tabela 3), diferindo das avaliações prévias do hospital no qual o paciente estava internado.

Tabela 3 - Subpopulações de linfócitos do paciente

Subtipos de Linfócitos	Exames MIHU	VR ¹	Exames GPIH	VR ¹
CD3+	4.078/mm ³ (52,2%)	3.701/mm ³ (p90)	1.325/mm ³ (54,3%)	1.515/mm ³ (p10)
CD4+	2.057/mm ³ (26,3%)	1,178-2.086/mm ³ (p50-p90)	747/mm ³ (30%)	789/mm ³ (p10)
CD8+	1.740/mm ³ (22,3%)	1.700/mm ³ (p90)	151/mm ³ (0,62%)	453 /mm ³ (p10)
CD19+	-	-	368/mm ³ (15,1%)	631/mm ³ (p10)

VR – Valor de Referência; MIHU: Unidade materno infantil do Hospital universitário da UFMA; GPIH: Grupo de Imunologia Humana da UFMA; p10-90: percentis nos quais se encaixam os valores dos pacientes.

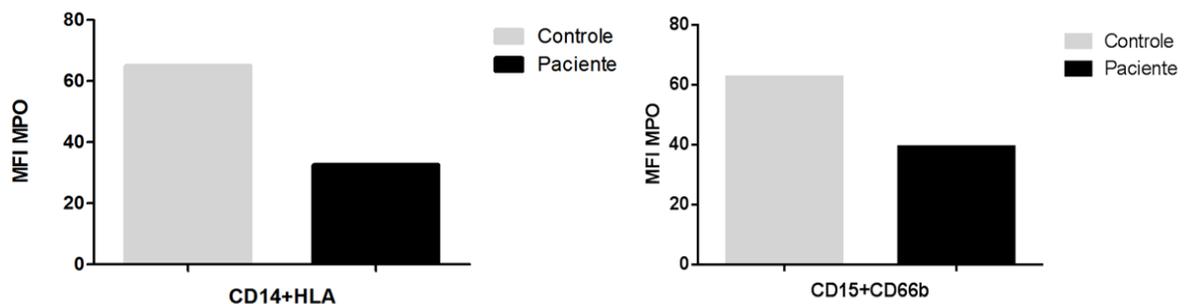
¹ MORAES-PINTO MI et al., 2005

5.3 Avaliação imunológica funcional

Além da variação na imunofenotipagem e da produção de anticorpos nos exames supracitados, foram observadas alterações funcionais da imunidade inata e adaptativa.

Mesmo apresentando contagens normais ao hemograma, a expressão de marcadores específicos da resposta de neutrófilos (CD66b) e monócitos (HLA-DR) encontrava-se reduzida em relação ao controle sadio utilizado (Figura 6).

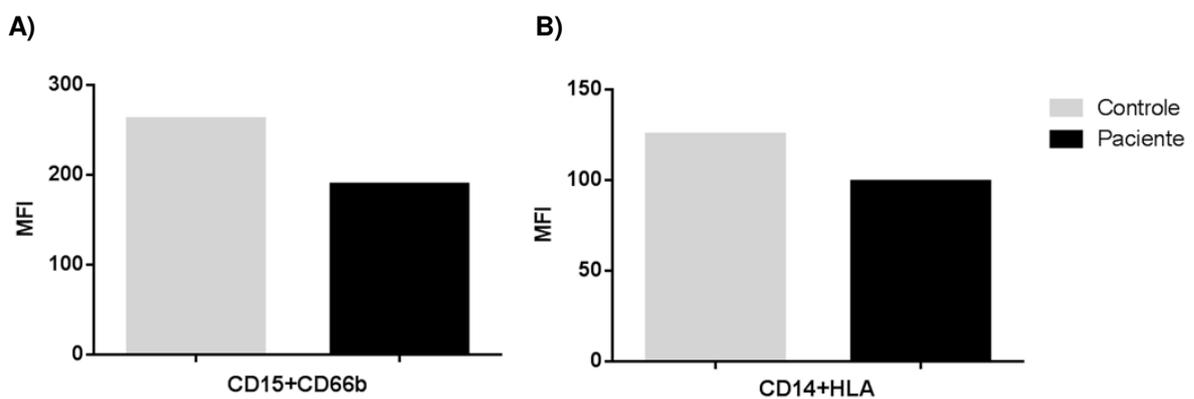
Figura 6 – Expressão de CD66b e HLA-DR, respectivamente, em neutrófilos e monócitos



Após a lise de hemácias e obtenção dos leucócitos totais, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD5 e anti-CD66b (neutrófilos) ou anti-CD14 e anti-HLA-DR (monócitos) para análise por citometria de fluxo.

Avaliando a produção de peróxido de hidrogênio, em resposta ao estímulo com PMA, os granulócitos do paciente demonstraram-se competentes na ativação do sistema NADPH oxidase. Entretanto, fizeram-no de maneira reduzida, se comparado ao controle sadio (Figura 7A). A produção do reativo pelos monócitos do paciente, cujos valores chegaram a ultrapassar o controle, também comprovam eficácia no funcionamento do sistema (Figura 7B).

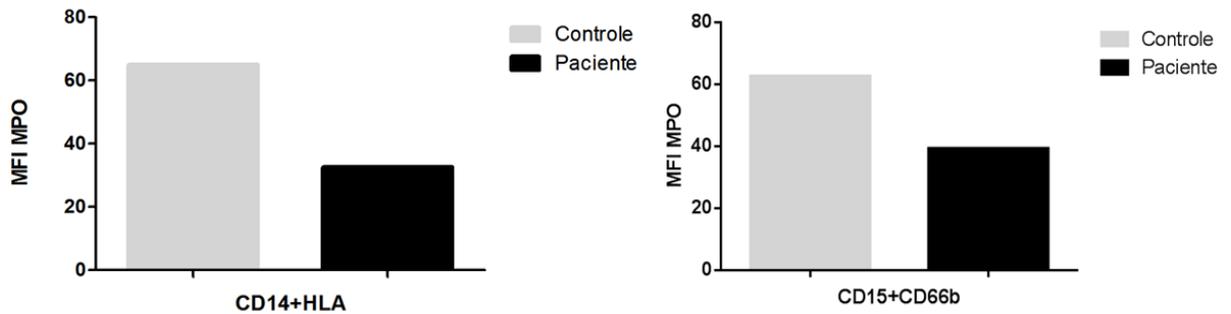
Figura 7 – Produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos e monócitos do paciente



Após uma hora de ativação *in vitro*, os leucócitos foram incubados na presença de 300 ng/mL de DHR e a produção de H₂O₂ foi avaliada para granulócitos (neutrófilos) (A) e monócitos (B), em resposta ao PMA (50nM) ou *C. albicans* (2:1). Os resultados estão expressos pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI). NM – Não Marcado; NE – Não Estimulado; CA – *Candida albicans*; PMA – Forbol Miristato Acetato (do inglês, *Phorbol Myristate Acetate*).

Ainda, realizou-se a análise da expressão da enzima mieloperoxidase, importante no contexto microbicida destas células. Tanto neutrófilos como monócitos do paciente apresentaram expressão reduzida da MPO em comparação ao controle (Figura 8).

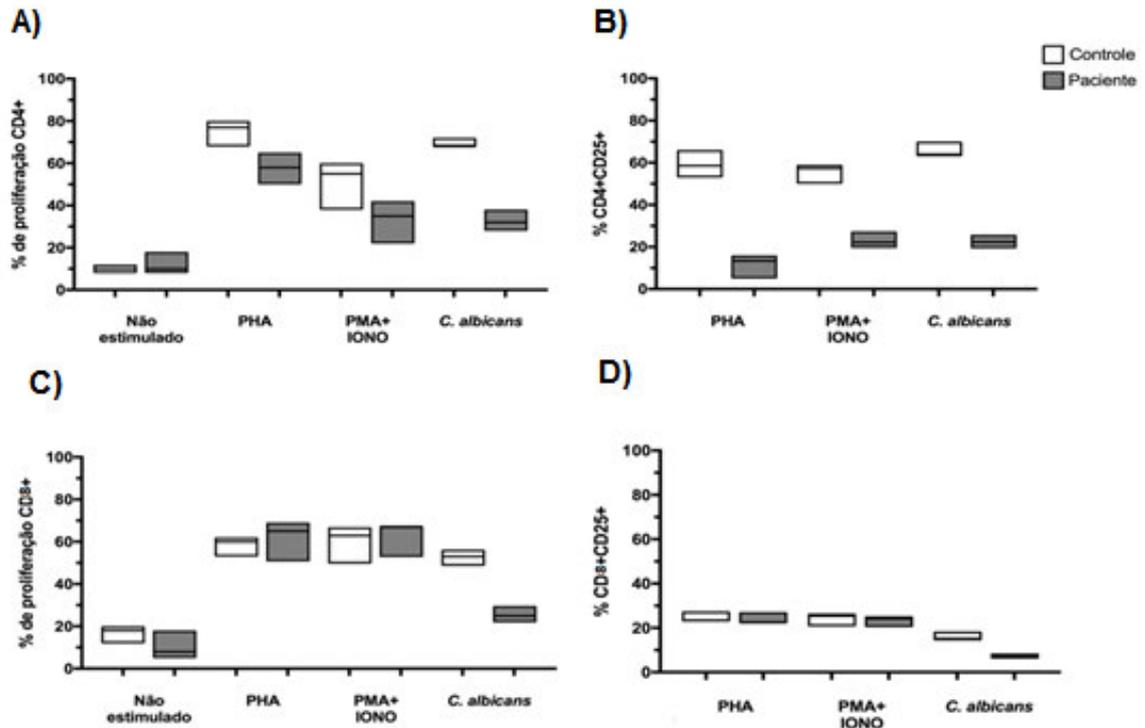
Figura 8 – Expressão da enzima mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos e monócitos do paciente



Após a lise de hemácias e obtenção dos leucócitos totais, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD15 e anti-MPO (neutrófilos) ou anti-CD14 e anti-MPO (monócitos). O padrão de expressão dos marcadores indicados foi analisado por citometria de fluxo e encontra-se expresso em mediana da intensidade de fluorescência (MFI).

Analisando o aspecto funcional de componentes da imunidade adaptativa, os resultados demonstraram uma evidente falha na proliferação e ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ (Figura 9).

Figura 9 - Ensaio de Linfoproliferação

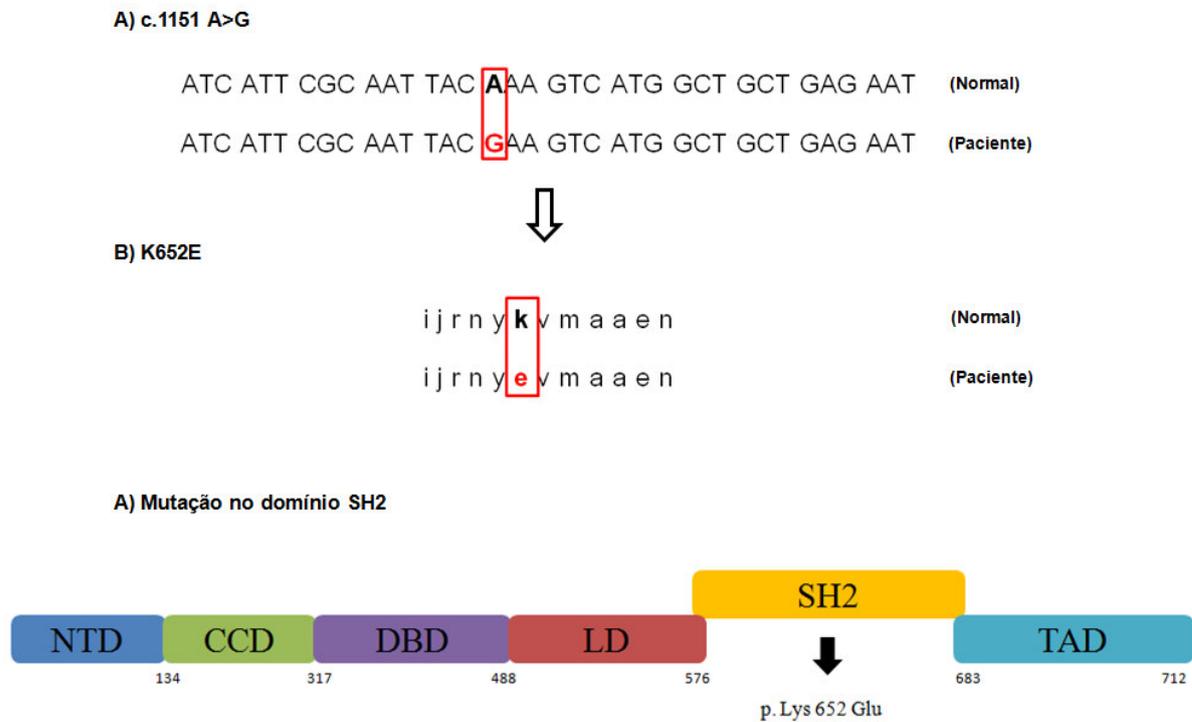


Após três dias de estimulação com PHA, PMA+inonomicina ou *C. albicans* (juntamente com monócitos) analisamos a linfoproliferação das células CD4+ e CD8+ do paciente. Os ensaios de proliferação foram analisados por citometria de fluxo e os resultados expressam a porcentagem de proliferação das células estimuladas em relação às células não estimuladas. A ativação dos linfócitos foi verificada, ainda, a partir da expressão do receptor de IL-2 (CD25), avaliada por citometria de fluxo e demonstrada em percentual de células ativadas. PHA – Fitohemaglutinina; PMA – Forbol Miristato Acetato (do inglês, *Phorbol Myristate Acetate*); IONO – Ionomicina. A) Ativação de linfócitos CD4+; B) Proliferação de Linfócitos CD4+; C) Ativação de Linfócitos CD8+; D) Proliferação de Linfócitos CD8+.

5.4 Análise Genética

Pela análise do gene *STAT1*, foi identificada mutação *missense* no braço longo do cromossomo 2, havendo substituição de uma adenina por uma guanina no éxon 22 (c.1151A>G). Tal alteração resulta em troca de uma lisina por um ácido glutâmico (p.Lys652Glu, K652E) no domínio SH2 da proteína (Figura 10).

Figura 10 – Paciente com Candidíase Mucocutânea Crônica apresenta nova mutação no gene *STAT1*



(A) Substituição de nucleotídeos na posição 1151 do gene *STAT1*, havendo a troca de uma adenina por uma guanina. (B) Modificação de aminoácidos na proteína de uma lisina (Lys) por um ácido glutâmico (Glu). (C) Representação esquemática da proteína *STAT1* demonstrando a mutação identificada e o domínio no qual se localiza. NTD – Domínio N-terminal (do inglês, *N-terminal domain*); CCD – Domínio Coiled-coil, (do inglês, *Coiled-coil Domain*); DBD – Domínio de Ligação ao DNA (do inglês, *DNA binding domain*); LD – Domínio de Ligação a Alfa-hélice (do inglês, *Alpha Helical Linker Domain*); SH2 – Domínio SRC Homólogo 2 (do inglês, *SRC Homology 2*); TAD – Domínio de Transativação (do inglês, *Transactivation Domain*).

6. Discussão

Com o propósito de esclarecer as alterações fisiológicas que levam ao aparecimento da Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC), o trabalho realizado foi direcionado à triagem imunológica de paciente com essa disfunção, já diagnosticada clinicamente. Ademais, conseguimos caracterizar os principais fatores patológicos associados, como microrganismos raros, e identificar defeitos imunológicos que vão desde a resposta inata à adaptativa, provenientes de uma mutação no gene *STAT1*.

A CMC é caracterizada por infecções persistentes, que acometem pele e mucosas, causadas por espécies de fungo do gênero *Candida spp.*, sendo *C. albicans* o principal agente etiológico da CMC (LI et al., 2017). No caso do paciente, a espécie *Candida lusitanea* foi também agente etiológico fundamental da CMC. À vista disso, a infecção é considerada oportunista e rara, apresentando-se de forma sistêmica. Não foram encontrados nas bases de dados SciELO (<http://www.scielo.org>) e PubMed PMC[®] (<http://www.pubmed.com>) registros e artigos referentes a infecção por *C. lusitanea* como principal patógeno associado a CMC. Descrever novas manifestações clínicas ou mesmo diferentes patógenos, como o caso aqui apresentado, ajuda na definição de parâmetros diagnósticos para estes pacientes. Dessa forma, existe a possibilidade da infecção por essa espécie ser um importante indicador de IDP.

C. lusitanea é sabidamente resistente à anfotericina B, antifúngico amplamente utilizado, sendo necessário uso de triazóis, eficazes no tratamento de infecções causadas pela espécie (HAWKINS & BADDOUR, 2003). Além da resistência do próprio patógeno, alterações fisiológicas podem dificultar o tratamento dessas infecções, como o declínio da resposta imunológica, elevando significativamente o risco de mortalidade (ALTER et al., 2018; NORTON, SHERWOOD & BENNETT, 2017).

Infecções fúngicas são comuns em pacientes HIV positivos, sendo *Candida sp.* um dos agentes etiológicos de maior importância clínica para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (HARTMANN et al, 2016). Os testes sorológicos descartaram a possibilidade de SIDA e hepatites virais, o que direcionou a investigação diagnóstica para causas relacionadas a falhas intrínsecas do sistema imune.

Com base nos resultados de exames realizados no serviço onde o paciente foi atendido, as principais alterações identificadas estiveram relacionadas ao quadro infeccioso, como a acentuada leucocitose evidenciada por neutrofilia ao hemograma. As proteínas do complemento e a proteína C reativa (PCR) também estiveram acima dos valores de referência, o que pode ser associado à resposta inflamatória decorrente da resposta à infecção ou mesmo do quadro de asma do paciente, relatado pelos pais (DA COSTA PARAHYBA, 2012; MOSCA, et al. 2011). Apesar dos diferentes exames analisados, os resultados não determinaram a etiologia para a CMC, levando à realização de avaliações funcionais dos leucócitos.

Considerando a importância dos mecanismos de resposta inata frente a infecções fúngicas, desde a fagocitose até a produção de substâncias microbidas, os resultados obtidos foram importantes para triar a funcionalidade das primeiras barreiras de defesa do organismo. Algumas IDPs de fagócitos, como a deficiência completa de mieloperoxidase (MPO) e falhas no *burst* oxidativo, podem comprometer a resposta imune a fungos (WOLACH et al., 2017). Os achados em relação ao *burst* oxidativo do paciente demonstraram capacidade de ativação eficaz frente a um estímulo genérico (PMA) ou à própria *Candida*, o que não ocorre em deficiências de subunidades protéicas do complexo NADPH oxidase (ABRAHAM & AUBERT et al., 2016).

Em contrapartida, a baixa expressão de MPO identificada nas células do paciente pode comprometer mecanismos microbidas relevantes, como a produção e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs; do inglês, *Neutrophil extracellular traps*) (KENNY et al, 2017). Após a produção de ânion superóxido pela NADPH oxidase, que é convertido pela superóxido desmutase (SOD) em H₂O₂, a MPO utiliza esses produtos na geração de reativos capazes de induzir a liberação do material citoplasmático que compõe as NETs para o meio extracelular (KHAN, ALSAHI & RAHMANI, 2018). Foi demonstrado comprometimento nessa sinalização para o caso estudado, relacionando os sintomas a falhas de resposta inata.

A diminuição da marcação de MPO nas células do paciente em relação às do controle pode não ter influência significativa nas manifestações clínicas observadas, uma vez que mesmo com expressão reduzida a enzima pode ter função adequada. Nesse contexto, outros mecanismos, como o eixo IFN- γ /IL-12, são importantes reguladores da resposta imune celular à fungos, tanto inata quanto adaptativa. A IL-12, que possui subunidades com funções específicas, é capaz de induzir a resposta

inflamatória ao passo que induz a diferenciação das linhagens de linfócitos Th1 e Th17. Estas, por sua vez, produzem IFN- γ potencializando a produção de IL-12 e a resposta imune a organismos intracelulares. A sinalização dessas citocinas é feita por receptores transmembranares que ativam as células por vias JAK/STAT (MA et al., 2015).

A tuberculose (TB) consiste na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* com acometimento dos pulmões, cuja principal manifestação clínica é a tosse persistente, sintoma evidente principalmente em situações de imunocomprometimento (MHIMBIRA et al., 2017). Células da resposta inata controlam a TB através de ação microbicida envolvendo os macrófagos, que tem sua diferenciação e ativação mediados por IFN- γ . Quando a resposta a TB tem sua integridade mantida, o equilíbrio entre mecanismos de escape da bactéria e sistema imune mantém a infecção forma latente, sendo assintomática (LIU, LIU & GE, 2017).

Desordens nesses mecanismos podem prejudicar a resposta contra fungos e patógenos intracelulares. Mutações de perda de função no fator de transcrição STAT1, que fazem parte da cascata de sinalização dos receptores de IFN- γ , podem ocasionar Susceptibilidade Mendeliana a Micobacterioses (MSMD, do inglês *Mendelian Susceptibility to Mycobacteria Diseases*) (CASANOVA & ABEL, 2017). A diminuição da sinalização pelo interferon reduz (a atividade fagocítica de macrófagos, essenciais na eliminação de micobactérias PEDRÁZA-SANCHEZ et al., 2017). Considerando a importância de IFN- γ na contenção de infecções fúngicas, paciente com MSMD também podem ser acometidos por patologias do gênero (BUSTAMANTE et al., 2017).

Levando-se em consideração a relevante relação entre CMC e deficiências de linfócitos, os ensaios funcionais da imunidade adaptativa foram importantes para o esclarecimento da base da manifestação clínica do paciente. Aumento nos títulos de IgA e IgG comprovam a função efetiva da imunidade humoral, no que diz respeito à função dos linfócitos B, excluindo a possibilidade de imunodeficiência de anticorpos. Os baixos títulos de IgE foram essenciais para que a hipótese de Síndrome de Hiper-IgE fosse descartada, visto que a doença também altera a resposta imune a fungos e pode se manifestar com quadro clínico semelhante ao da CMC. Uma vez que a resposta da linfócitos B caracteriza-se dentro da normalidade, os linfócitos T chamaram atenção por conta de alterações em seu número e potencial de resposta.

Variações genéticas nas células T podem comprometer a diferenciação dessas células para os perfis Th1 e Th17, fundamentais na resposta fungicida, sistêmica ou de barreiras, respectivamente (PUEL et al., 2012; VOGEL, MILNER & COOPER, 2015). Apesar da presença das células T CD3+CD4+ no sangue, as falhas na sua proliferação estão relacionadas com um potencial de resposta reduzido frente à fungos. Este tipo de déficit funcional está associado a mutações em fatores de transcrição dessas células, como já foi comprovado em casos de aumento das fosforilações de STAT1 nas células CD4+ (TOUBIANA et al., 2016).

O perfil de linfócitos nas CMC pode não apresentar alterações marcantes nas contagens total e de subpopulações de linfócitos T CD3+. Entretanto, encontramos poucas células T e B no paciente, o que pode ser justificado pela exaustão do sistema de hematopoiese em resposta a seguidas infecções ou relacionado à falhas na linfoproliferação. Verificou-se esta última possibilidade como a desregulação, principalmente para células CD4+, do potencial de expansão e multiplicação celular. Além disso, a marcação para a cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25) encontrava-se reduzida nas células T CD4+ do paciente, mesmo após diferentes estimulações (WATERS et al., 2017). Desse modo, pode-se verificar uma falha no potencial funcional das linfócitos T auxiliares do paciente.

De acordo com as manifestações clínicas e infecções apresentadas pelo paciente e o perfil de resposta imunológica defeituoso de linfócitos CD4+, sugerimos uma falha na sinalização do STAT1 como base para o caso. Pela análise genética, foi possível identificar mutação *missense* no éxon 22 do gene *STAT1* (c.1151A>G). Esta mutação apresenta reflexo no domínio SH2 da proteína STAT1, uma das regiões responsáveis por regular a função celular da proteína e envolvida na função de fator de transcrição genética. Ainda, após a fosforilação pela JAK (na posição Tyr-701) e dimerização dos monômeros STAT1, as regiões SH2 devem estar paralelamente opostas para adequada ativação do fator e transcrição do material genético. Mutações SH2 podem alterar a estrutura desses monômeros e conseqüentemente sua relação anti-paralela, modificando as interações e o padrão de ativação da proteína (STAAB et al, 2013).

Tais alterações são verificadas na estimulação com interferons, ocasionando aumento de fosforilações em células T em pacientes com mutações em SH2 de STAT1 que caracterizam ganho de função. Genes responsáveis pela produção de IL-27 podem ser mais expressos nesses casos, inibindo a proliferação Th17 (FUJIKI

et al., 2017; MEESILPAVIKKAI et al., 2017). Variações na funcionalidade de STAT-1 podem levar a fenótipos característicos associados a infecções por micobactérias e fungos, relacionados a alterações na resposta dos leucócitos aos interferons. Além das micobactérias, a espécie *S. aureus* é comumente identificadas como causadoras de infecções nos pacientes com mutações em *STAT1*, que geralmente acometem o trato respiratório inferior. Em mutações de ganho de função, a CMC é a manifestação clínica predominante na maioria dos casos (KAGAWA et al., 2017; TOUBIANA et. al., 2016). Pedraza-Sánchez et al. (2017) identificaram mutação em *STAT1*, com comprometimento da produção de IFN- γ e aumento na produção de IL-12, refletindo sobre a produção de IL-17 e inibição Th17. As manifestações envolveram CMC e micobacterioses, assim como os fenótipos descritos para o caso estudado neste trabalho.

A partir dos achados fenotípicos e funcionais, podemos sugerir que a troca de aminoácidos no domínio SH2 da proteína STAT1 ocasionou modificação nos mecanismos de fosforilação da proteína. Estas alterações comprometeram as funções da proteína e a resposta imunológicas dependentes dessa sinalização, como a proliferação de linfócitos e a ativação de fagócitos. Mais uma vez, também, foi comprovada a relação das mutações neste gene aos casos de CMC, afetando diversos mecanismos da resposta imune. Entretanto, serão necessários estudos de bioinformática para determinação das alterações específicas na proteína causadas pela troca de aminoácidos (K652E), visto que a perda do paciente nos impossibilita de realizar novas análises funcionais *in vitro*.

7 Conclusão

Por meio da avaliação clínica e a realização de triagem imunológica específica, foi confirmado o perfil fenotípico de Imunodeficiência Primária em paciente com Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC).

Foi identificada, pela primeira vez, *Candida lusitanae* como agente etiológico principal para a CMC.

Detectamos alterações na resposta imune a *Candida* spp. pela reduzida atividade da mieloperoxidase de neutrófilos e monócitos, e falhas na resposta de proliferação e ativação (expressão de CD25) de linfócitos T.

Identificamos uma nova mutação (c.1151A>G; p.Lys652Glu, K652E) com reflexo no domínio SH2 da proteína STAT1, justificando os defeitos, mesmo que brandos, de resposta imune inata e adaptativa frente às infecções.

8 Considerações Finais

A partir de investigações laboratoriais adequadas, considerando as manifestações clínicas dos pacientes, pôde ser concluído o diagnóstico de Imunodeficiência Primária. Para o caso apresentado, a triagem imunológica e análise genética possibilitaram a identificação específica da IDP, ressaltando a importância dos sinais de alerta para estas doenças. Ainda, foi possível caracterizar os padrões fenotípicos de mutação ainda não documentada de STAT1, gerando dados relevantes para o meio acadêmico. Com os resultados obtidos, os estudos sobre IDP no Maranhão foram alavancados, fortalecendo o trabalho realizado pelo Grupo de Pesquisa em Imunologia Humana (GPIH) da UFMA na identificação de casos de IDPs e educação continuada. Por fim, os dados gerados são relevantes no âmbito da conscientização sobre a identificação de IDPs, acrescentando informações com potencial para auxiliar outros profissionais no desenvolvimento e melhora de investigação diagnóstica dessas doenças e melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.
- AMBROSE, Mark; GATTI, Richard A. Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions. **Blood**, v. 121, n. 20, p. 4036-4045, 2013.
- ABRAHAM, Roshini S.; AUBERT, Geraldine. Flow Cytometry: A Versatile Tool For Diagnosis And Monitoring Of Primary Immunodeficiencies (PIDs). **Clinical and Vaccine Immunology**, p. CVI. 00001-16, 2016.
- ALTER, Sherman J. et al. Common child and adolescent cutaneous infestations and fungal infections. **Current problems in pediatric and adolescent health care**, v. 48, n. 1, p. 3-25, 2018.
- AZARSIZ, Elif et al. In vitro T lymphocyte proliferation by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester method is helpful in diagnosing and managing primary immunodeficiencies. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 32, n. 1, p. e22216, 2018.
- BONILHA, Luís Roberto et al. Doença granulomatosa crônica: diagnóstico no primeiro episódio infeccioso. **Revista Paulista de Pediatria**, 2010.
- BOUSFIHA, Aziz et al. The 2017 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. **Journal of clinical immunology**, v. 38, n. 1, p. 129-143, 2018.
- BUSTAMANTE, Jacinta et al. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. **Nature immunology**, v. 12, n. 3, p. 213, 2011.
- CASANOVA, Jean-Laurent; ABEL, Laurent. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 2, p. 197-201, 2005.
- CHAMBÔ FILHO, Antônio et al. Chronic mucocutaneous candidiasis: a case with exuberant cutaneous horns in nipples. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 4, p. 641-644, 2014.
- CHAPEL, Helen et al. Primary immune deficiencies—principles of care. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 627, 2014.
- CHOPRA, C. et al. Immune deficiency in Ataxia-Telangiectasia: a longitudinal study of 44 patients. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 176, n. 2, p. 275-282, 2014.
- CONDINO-NETO, A. et al. Current state and future perspectives of the Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID). **Allergologia et immunopathologia**, v. 43, n. 5, p. 493-497, 2015.
- DA COSTA PARAHYBA, Marília Joffily Pereira et al. Alguns aspectos avaliativos do hemograma em crianças com pneumonia. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 16-22, 2012.

FLEISHER, Thomas A.; MADKAIKAR, Manisha; ROSENZWEIG, Sergio D. Application of flow cytometry in the evaluation of primary immunodeficiencies. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 5, p. 444-449, 2016.

FUJIKI, Ryoji et al. Molecular Mechanism and Structural Basis of Gain of Function of STAT1 Caused by Pathogenic R274Q Mutation. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M116. 753848, 2017.

HARTMANN, Andreia et al. Incidência de Candida spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Ângelo-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 3, p. 125-130, 2016.

HAWKINS, Jimmy L.; BADDOUR, Larry M. Candida lusitanae infections in the era of fluconazole availability. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p. e14-e18, 2003.

HUPLER, Anna R.; BISHU, Shrinivas; GAFFEN, Sarah L. Mucocutaneous candidiasis: the IL-17 pathway and implications for targeted immunotherapy. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n. 4, p. 217, 2012.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature immunology**, v. 16, n. 4, p. 343, 2015.

KAGAWA, Reiko et al. Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss-or gain-of-function variants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 1, p. 232-241, 2017.

KENNY, Elaine F. et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. **Elife**, v. 6, p. e24437, 2017.

KEPENEKLIKADAYIFCI, Eda et al. IL12R β 1 defect presenting with massive intra-abdominal lymphadenopathy due to Mycobacterium intracellulare infection. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 35, p. 161-165, 2017.

KHAN, Amjad; ALSAHLI, Mohammed; RAHMANI, Arshad. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: Recent biochemical and pathological perspectives. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 33, 2018.

KOONIN, Eugene V.; KRUPOVIC, Mart. Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 3, p. 184, 2015

LI, Juan et al. Inborn errors of immunity underlying fungal diseases in otherwise healthy individuals. **Current opinion in microbiology**, v. 40, p. 46-57, 2017.

LIU, Cui Hua; LIU, Haiying; GE, Baoxue. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. **Cellular & molecular immunology**, v. 14, n. 12, p. 963, 2017.

MA, Xiaojing et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Research**, v. 4, 2015.

MADOFF, Lawrence C.; KASPER, Dennis L. Introdução às Doenças Infecciosas: Interações Patógeno-Hospedeiro. **Doenças Infecciosas de Harrison**, p. 2, 2015.

MEESILPAVIKKAI, Kornvatee et al. A novel heterozygous mutation in the STAT1 SH2 domain causes chronic mucocutaneous candidiasis, atypically diverse infections, autoimmunity, and impaired cytokine regulation. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 274, 2017.

MHIMBIRA, Francis A. et al. Interventions to increase tuberculosis case detection at primary healthcare or community-level services. **The Cochrane Library**, 2017.

MIZOGUCHI, Yoko et al. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Journal of leukocyte biology**, v. 95, n. 4, p. 667-676, 2014.

MODELL, Vicki et al. Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell Centers Global Network. **Immunologic research**, v. 64, n. 3, p. 736-753, 2016.

MOSCA, Tainá et al. Componentes C3 e C4 do sistema complemento como biomarcadores no diagnóstico de asma atópica intermitente. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 6, 2011.

NORTON, Emily L.; SHERWOOD, Racquel K.; BENNETT, Richard J. Development of a CRISPR-Cas9 system for efficient genome editing of *Candida lusitanae*. **mSphere**, v. 2, n. 3, p. e00217-17, 2017.

OLIVEIRA, Raimundo Antonio Gomes. Hemograma: como fazer e interpretar. **Livraria Médica Paulista Ltda: São Paulo**, 2007

OKADA, Satoshi et al. Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. **Clinical & translational immunology**, v. 5, n. 12, p. e114, 2016.

PEDRAZA-SÁNCHEZ, Sigifredo et al. Disseminated Tuberculosis and Chronic Mucocutaneous Candidiasis in a Patient with a Gain-of-Function Mutation in Signal Transduction and Activator of Transcription 1. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1651, 2017.

PILMIS, B. et al. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 681-687, 20

PLATO, Anthony; HARDISON, Sarah E.; BROWN, Gordon D. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 97-106.

PUEL, Anne et al. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 12, n. 6, p. 616, 2012.

ROUTES, John et al. ICON: the early diagnosis of congenital immunodeficiencies. **Journal of clinical immunology**, v. 34, n. 4, p. 398-424, 2014.

RUGGERO ERRANTE, Paolo; MENEZES RODRIGUES, Francisco Sandro; RIBEIRO NOGUEIRA FERRAZ, Renato. Avaliação do NF-κB na regulação gênica do sistema NADPH oxidase em pacientes com displasia ectodérmica com imunodeficiência. **ConScientiae Saúde**, v. 15, n. 1, 2016.

SCANZANO, Angela; COSENTINO, Marco. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 171, 2015.

SCHUSSLER, Edith; BEASLEY, Mary B.; MAGLIONE, Paul J. Lung disease in primary antibody deficiencies. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 6, p. 1039-1052, 2016.

SELEMAN, Michael et al. Uses of next-generation sequencing technologies for the diagnosis of primary immunodeficiencies. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 847, 2017.

STAAB, Julia; HERRMANN-LINGEN, Christoph; MEYER, Thomas. Clinically relevant dimer interface mutants of STAT1 transcription factor exhibit differential gene expression. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69903, 2013.

TANGYE, Stuart G. et al. The good, the bad and the ugly—T FH cells in human health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 412, 2013.

VAN DONGEN, Jacobus Johannes Maria et al. **Methods, Reagents and Kits for Flow Cytometric Immunophenotyping**. U.S. Patent Application n. 15/848,719, 28 jun. 2018.

VAN SCHOUWENBURG, Pauline A. et al. Application of whole genome and RNA sequencing to investigate the genomic landscape of common variable immunodeficiency disorders. **Clinical immunology**, v. 160, n. 2, p. 301-314, 2015.

VOGEL, Tiphany P.; MILNER, Joshua D.; COOPER, Megan A. The ying and yang of STAT3 in human disease. **Journal of clinical immunology**, v. 35, n. 7, p. 615-623, 2015.

WACLECHE, Vanessa et al. The Th17 lineage: from barrier surfaces homeostasis to autoimmunity, cancer, and HIV-1 pathogenesis. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 303, 2017.

WATERS, Ryan S. et al. The effects of interleukin-2 on immune response regulation. **Mathematical medicine and biology: a journal of the IMA**, v. 35, n. 1, p. 79-119, 2017.

WOLACH, Baruch et al. Chronic granulomatous disease: clinical, functional, molecular, and genetic studies. The Israeli experience with 84 patients. **American journal of hematology**, v. 92, n. 1, p. 28-36, 2017.

ANEXO I – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal do Maranhão

Hospital Universitário – Materno Infantil

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: *Diagnóstico e Estudo Clínico-Laboratorial de Imunodeficiências Primárias no Estado do Maranhão*

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós.

Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao (à) seu (sua) filho (a).

Eu

.....
 , RG , abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a)

.....
 nascido (a) em ___/___/___, seja voluntário do estudo “**Diagnóstico e Estudo Clínico-Laboratorial de Imunodeficiências Primárias no Estado do**

Maranhão". Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

- I) O estudo é necessário para que se possam desenvolver exames diagnósticos e tratamentos para o mau ou não funcionamento do sistema imunológico (sistema de "defesa" do organismo Contra infecções), doenças chamadas de imunodeficiências primárias;
- II) Será feita uma coleta de 5 a 15 mL de sangue, num período de 1 mês do (a) meu (minha) filho (a). Os riscos da retirada de sangue são: hematoma local ("rouxidão"), algum desconforto e, raramente, tontura;
- III) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido (a);
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;
- VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;
- VIII) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFMA - no Fone 3272-8708 (e-mail: cepufma@ufma.br) ou Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira no fone 8346-9996 (e-mail: pereirapvs@gmail.com) para dúvidas, recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética desta Instituição e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu (minha) filho (a).
- X) () Sim ou () Não

- XI) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XIII) Resolução 196/96 – Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

OBS: Assinalar abaixo com (x):

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Luís, de _____ de 20__.

Paciente / Responsável _____

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha2: _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira

Departamento de Patologia – UFMA