

Universidade de São Paulo  
Instituto de Ciências Biomédicas

RAÍSSA LACERDA PONTES

**DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, GENÉTICA E  
IMUNOLÓGICA DE PACIENTES COM SUSCEPTIBILIDADE A INFECÇÕES E  
HIPERINFLAMAÇÃO**

São Paulo

2022

RAÍSSA LACERDA PONTES

**DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, GENÉTICA E  
IMUNOLÓGICA DE PACIENTES COM SUSCEPTIBILIDADE A INFECÇÕES E  
HIPERINFLAMAÇÃO**

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

Departamento de Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

Laboratório de Imunologia Humana

São Paulo

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lacerda Pontes, Raissa  
Doença Granulomatosa Crônica: caracterização  
clínica, genética e imunológica de pacientes com  
susceptibilidade a infecções e hiperinflamação /  
Raissa Lacerda Pontes; orientador Prof. Dr.  
Antonio Condino Neto. -- São Paulo, 2022.  
87 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Imunodeficiências primárias. 2. DGC. 3.  
células dendríticas. 4. Linfócitos. 5. resposta  
Th1/Th17. I. Condino Neto, Prof. Dr. Antonio ,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Raíssa Lacerda Pontes

Título da Dissertação/Tese:

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

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

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

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

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

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

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Dedico esta dissertação:

A minha família,

Pelo constante incentivo.

Aos pacientes raros,

Que precisam de vozes para os ajudar em suas jornadas.

## **Agradecimentos**

A Deus.

Aos pacientes, que embora convivam constantes momentos de aflição ocasionado por suas condições, sentem-se motivados a colaborar com o avanço dos estudos acerca da DGC e assim contribuir com a melhoria de vida de futuros novos pacientes.

Aos Prof. Dr. Antônio Condino Neto e Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira pelo apoio, incentivo e oportunidade de aprendizagem ao decorrer desse projeto.

A Dra. Janáira Fernandes, Dra. Ekaterini Goudouris e Dra. Carolina Aranda e suas equipes pela colaboração e proatividade os quais foram fundamentais para o desenvolvimento dessa dissertação.

A técnica Christina Arslanian pelos conselhos e ensinamentos.

A Silvana, pela eficiente contribuição nas questões burocráticas referentes ao projeto.

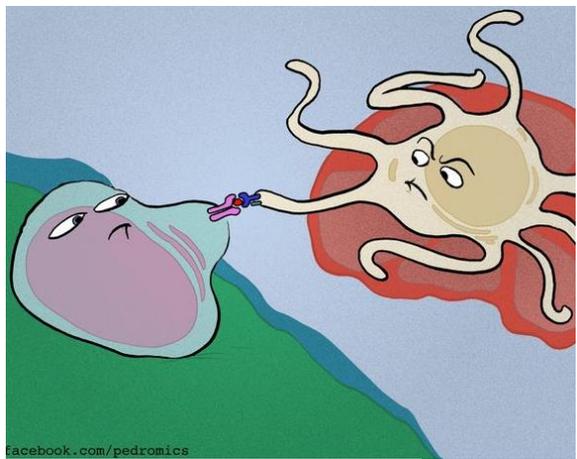
Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia Humana, Tábata, Lucila, Letícia, Ranata, Lillian, Sarah, Ranieri e Thiago. Cada um contribuiu no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores Dr. Sandro, Dr. Flávio e Dra. Bruna pelas sugestões e críticas fundamentais para o amadurecimento dessa dissertação durante o Exame de qualificação.

A Eni e Profa. Dra. Ana Paula pela ajuda.

Agradeço ainda a CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, o qual possibilitou a execução dessa pesquisa.

Por fim, agradeço de todo meu coração a minha família: aos meus pais, Rejane e Antônio, a minha irmã Rafaella e meu companheiro Jackson. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, incentivando, torcendo por mim. Vocês me dão força para continuar e alegam a minha vida.



facebook.com/pedromics

Fonte: <https://twitter.com/pedromics>

## RESUMO

Lacerda-Pontes, R. Doença Granulomatosa Crônica: caracterização clínica, genética e imunológica de pacientes com susceptibilidade a infecções e hiperinflamação. [Dissertação (mestrado em Imunologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A Doença Granulomatosa Crônica é caracterizada pela falha da explosão respiratória em fagócitos devido a perda de função da NADPH oxidase, gerando quadros de susceptibilidade a infecções e hiperinflamação, cujos mecanismos permanecem pouco esclarecidos. Nosso trabalho analisou uma coorte de 11 pacientes DGC com quadro clínico compatível com DGC (como abscessos, pneumonias, granulomas, infecções bacterianas e fúngicas). Foram identificadas variantes patogênicas em 5 pacientes, sendo 4 no gene *CYBB* e 1 no *NCF1*. A partir dessa coorte, investigamos respostas realizadas por células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC) e a polarização de linfócitos T de pacientes DGC em comparação com indivíduos saudáveis. Mo-DCs cultivadas com LPS, *Candida albicans* e BCG apresentaram elevada expressão do marcador CD1a, redução da expressão de CD40 e perfis de citocinas favorecendo a polarização de linfócitos Th17 (elevada produção de IL-23 e IL-6) e desfavorecendo resposta Th1 (baixa produção de IL-12p70). Linfócitos T efetores cocultivados com mo-DCs maduras autólogas de pacientes DGC apresentaram capacidade normal de diferenciação de células T *naïve* em células T efetoras Th1 e Th17, porém há uma hiperexpressão do eixo Th17, evidenciado pelo aumento da expressão de IL-23 pelas mo-DCs, aumento da população de linfócitos Th17 e a produção exacerbada de IL-17A e IL-6 por linfócitos. A hiperativação do eixo Th17 tem sido relatado em uma gama de doenças inflamatórias, como doença inflamatória intestinal, psoríase, artrite reumatoide e esclerose múltipla. O estudo apontou possíveis novos mecanismos relacionados a hiperinflamação e a susceptibilidade a infecções bacterianas e fúngicas em DGC.

**Palavras-chave:** Células dendríticas, Linfócitos T, resposta Th17.

## Abstract

Lacerda-Pontes, R. Chronic granulomatous disease: clinical, genetic and immunological characterization of patients with susceptibility to infections and hyperinflammation. [Masters thesis (Immunology)]. Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Chronic Granulomatous Disease is characterized by failure of the respiratory burst in phagocytes due to loss of NADPH oxidase function, generating susceptibility to infections and hyper-inflammation whose mechanisms remain unclear. Our study analyzed a cohort of 11 CGD patients with a clinical picture of CGD (such as abscesses, pneumonia, granulomas, bacterial and fungal infections). Pathogenic variants were identified in 5 patients, 4 in the *CYBB* gene and 1 in the *NCF1*. From this cohort, we investigated responses performed by monocyte-derived dendritic cells (mo-DC) and the polarization of T lymphocytes from CGD patients compared to healthy subjects. Mo-DCs cultured with LPS, *Candida albicans* and BCG showed high expression of the CD1a marker, reduced expression of CD40 and cytokine profiles favoring the polarization of Th17 lymphocytes (elevated production of IL-23 and IL-6) and disfavoring the Th1 response (low production of IL-12p70). Effector T lymphocytes co-cultured with mature autologous mo-DCs from CGD patients showed normal ability to differentiate from naive T cells into Th1 and Th17 effector T cells, but there is a hyperexpression of the Th17 axis, evidenced by the increased expression of IL-23 by the DCs, an increase in the Th17 lymphocyte population and the exacerbated production of IL-17A and IL-6 by lymphocytes. Hyperactivation of the Th17 axis has been reported in a range of inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease, psoriasis, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. Our study provided additional about the immunopathology of CGD and its mechanisms related to hyperinflammation and susceptibility to bacterial and fungal infections.

**Keywords:** Dendritic cells, T lymphocytes, Th17 response.

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1.</b> Visão geral esquemática da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase na membrana plasmática ou fagossomal. ....	17
<b>Figura 2.</b> Principais interações realizadas durante a sinapse imunológica e os três sinais que induzem a ativação e diferenciação de linfócitos T.....	25
<b>Figura 3.</b> Modelo para diferenciação de linfócitos T CD4+ <i>naïve</i> . ....	27
<b>Figura 4.</b> Diferenciação e maturação de células dendríticas derivadas de monócitos.....	35
<b>Figura 5.</b> Representação gráfica da estratégia de análise utilizada na caracterização da expressão de marcadores extracelulares em monócitos, mo-DCs imaturas e mo-DCs maduras. ....	37
<b>Figura 6.</b> Cocultura de linfócitos T com células dendríticas derivadas de monócitos. ....	39
<b>Figura 7.</b> Estratégia de análise de imunofenotipagem de linfócitos T <i>naïve</i> cocultivados com mo-DCs.....	41
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas de sequências de DNAG do exon 5 do gene <i>CYBB</i> . ....	47
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas de sequências de DNAG do exon 2 do gene <i>NCF1</i> . ....	48
<b>Figura 10.</b> Morfologia e padrão da expressão de marcadores CD14, HLA-DR, CD11c, CD1a, CD83, CD40, CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas derivadas de monócitos. ...	50
<b>Figura 11.</b> Expressão das moléculas HLA-DR e CD1a na superfície de mo-DCs de indivíduos saudáveis e pacientes DGC.....	52
<b>Figura 12.</b> Expressão das moléculas CD80 e CD86 na superfície de mo-DCs de indivíduos saudáveis e pacientes DGC.....	53
<b>Figura 13.</b> Expressão das moléculas CD40 e CD83 na superfície de mo-DCs de indivíduos saudáveis e pacientes DGC.....	54
<b>Figura 14.</b> Quantificação da produção de Il-12 (A), IL-10 (B), IL-23 (C), IL-6 (D) e TNF- $\alpha$ (E) presentes no sobrenadante de culturas de mo-DCs avaliados pelo ensaio de ELISA. ....	56
<b>Figura 15.</b> Avaliação de populações de linfócitos Th1 e Th17 efetores em Pacientes DGC e indivíduos controle. ....	58
<b>Figura 16.</b> Quantificação da produção de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-6 presentes no sobrenadante de coculturas de linfócitos T <i>naïve</i> cocultutivados com mo-DCs estimuladas com BCG (5:1 MOI), LPS (100 ng/mL) e <i>Candida albicans</i> (2:1 MOI) por ELISA. ....	60

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Organismos comuns e tratamentos na infecção na Doença Granulomatosa Crônica. .....	21
<b>Tabela 2.</b> Painel de anticorpos para marcação de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos. ....	36
<b>Tabela 3.</b> Painel de anticorpos para marcação de linfócitos T cocultivados com mo-DCs.....	40
<b>Tabela 4.</b> Citocinas quantificadas em ensaios de cultura de mo-DCs e cocultura de mo-DCs com linfócitos T.....	42
<b>Tabela 5.</b> Caracterização clínica dos pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC). .....	45

## Lista de abreviaturas e siglas

<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette- Guérin
<b>CD</b>	Grupamento de diferenciação
<b>CYBA</b>	cadeia alfa do citocromo b-245
<b>CYBB</b>	cadeia beta do citocromo b-245
<b>CYBC1</b>	do inglês, <i>Cytochrome B-245 Chaperone 1</i> .
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DGC</b>	Doença granulomatosa crônica
<b>DGC-AR</b>	Doença granulomatosa crônica autossômica recessiva
<b>DGC-XR</b>	Doença granulomatosa crônica ligada ao X recessiva
<b>DHR</b>	Dihidrorrodamina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNAg</b>	Ácido desoxirribonucleico genômico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunabsorbância ligado à enzima
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FSC</b>	Do inglês, <i>Forward Scatter</i>
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HLA-DR</b>	Antígeno leucocitário humano
<b>HOCl</b>	ácido hipocloroso
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IUIS</b>	do inglês, Internation Union of Immunological Societies
<b>IVAS</b>	Infecção das vias aéreas superiores
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LT</b>	Linfócitos T
<b>MFI</b>	Mediana da intensidade de fluorescência
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>mo-DC</b>	Células dendríticas derivadas de monócitos
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NADPH oxidase</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NBT</b>	do inglês, <i>Nitroblue tetrazolium</i>
<b>NCF1,</b>	do inglês, <i>Neutrophil Cytosolic Factor 1</i> . Gene codificador da p47phox.
<b>NCF2</b>	do inglês, <i>Neutrophil Cytosolic Factor 2</i> . Gene codificador da p67phox.
<b>NCF4</b>	do inglês, <i>Neutrophil Cytosolic Factor 4</i> . Gene codificador da p40phox.
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxila
<b>OMIM</b>	do inglês, <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>PMA</b>	Forbol-12-meristato-13-acetato

<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>SNPs</b>	polimorfismos de nucleotídeo único
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SSC</b>	Do inglês, Side Scatter
<b>STAT</b>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
<b>T-bet</b>	Fator de transcrição T-box expresso em células T
<b>Th</b>	Linfócito T auxiliar
<b>TLRs</b>	Receptores semelhantes ao Toll
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>WES</b>	Do inglês, <i>Whole exome sequencing</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Doença Granulomatosa Crônica .....	16
1.2 Manifestações clínicas .....	19
1.2.2 Hiperinflamação .....	21
1.3 NADPH oxidase e a resposta imune inflamatória .....	22
1.3.1 Papel das células dendríticas na inflamação .....	23
1.3.2 Respostas pró-inflamatórias linfocitárias: Th1 e Th17.....	26
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo geral .....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
3.1 Casuística.....	32
3.2 Investigação genético-molecular .....	32
3.2.1 Obtenção das amostras de DNA genômico (gDNA).....	32
3.2.2 Sequenciamento do exoma completo (WES) .....	33
3.2.3 Sequenciamento de Sanger .....	34
3.3 Investigação da hiperinflamação em pacientes DGC .....	34
3.3.1 Isolamento de monócitos e linfócitos T <i>naïve</i> a partir de <i>PBMC</i> .....	34
3.3.2 Diferenciação e maturação de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs)...	35
3.3.4 Avaliação fenotípica de mo-DC imaturas e maduras .....	36
3.3.5 Viabilidade celular por exclusão colorimétrica com azul de tripan 0,4% .....	38
3.3.6 Avaliação do perfil fenotípico de linfócitos T co-cultivados com mo-DCs.....	38
3.3.7 Dosagem de citocinas .....	42
3.3.8 Análise estatística .....	42
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 Análise clínica e laboratoriais dos pacientes DGC.....	44
4.2 Variantes genéticas identificadas nos pacientes DGC.....	47
4.3 Avaliação das células dendríticas a partir monócitos (mo-DCs).....	49
4.4 As mo-DCs de pacientes DGC apresentam alterações fenotípicas .....	51
4.4.1 Avaliação de HLA-DR e CD1a em mo-DCs de pacientes DGC .....	51
4.4.2 Avaliação de CD80, CD86, CD83 e CD40 em pacientes DGC .....	53
4.4.3 Avaliação da produção de citocinas por mo-DCs de pacientes DGC .....	55

4.4.4 Linfócitos T CD4+ de pacientes DGC apresentam desequilíbrio da resposta Th1/Th17	57
4.4.5 Avaliação da expressão de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-6 em cocultura de mo-DCs com linfócitos T de pacientes DGC.....	59
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Doença Granulomatosa Crônica

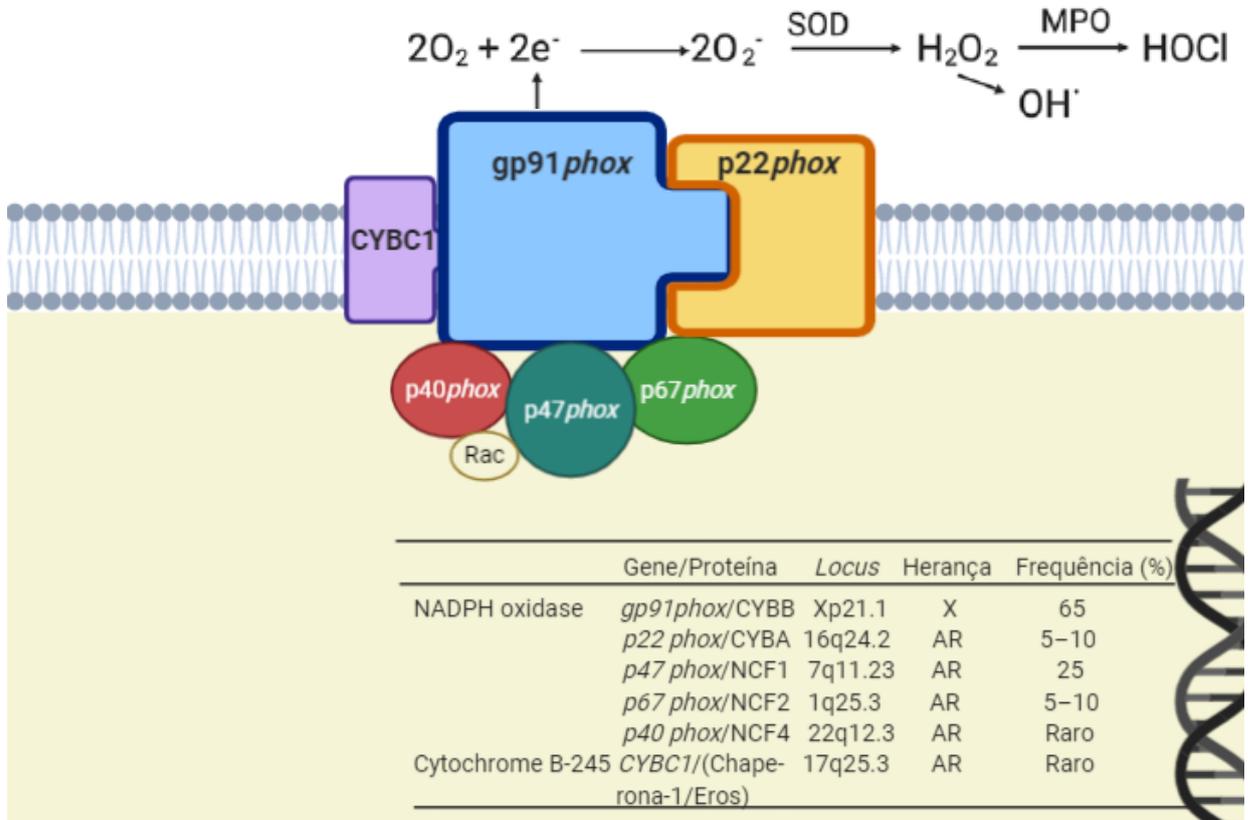
A doença granulomatosa crônica (DGC) (OMIM #306400, #233690, #233700, #233710, #608203 e #618334) é uma imunodeficiência primária rara ocasionada por mutações em genes que codificam componentes do complexo NADPH oxidase, acarretando falha na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerando uma explosão respiratória inadequada pelas células fagocíticas profissionais. Os pacientes DGC apresentam suscetibilidade a infecções fúngicas, bacterianas e raramente parasitárias, podendo haver formação de granulomas e hiperinflamação sistêmica. (Lent-Schochet e Jialal, 2021).

As primeiras descrições da DGC na literatura foram realizadas por Janeway (1954), Berendes (1957) e Landing e Shirkey (1957), que apontavam uma síndrome de infecções recorrentes, graves e crônicas. Apenas em 1959 ocorreu um registro mais robusto das características clínicas, patológicas e laboratoriais. Inicialmente, a DGC foi denominada doença granulomatosa fatal (Bridges, Berendes e Good, 1959), contudo, avanços nas ciências biomédicas permitiram o diagnóstico e tratamentos profiláticos, levando a mudança na nomenclatura para doença granulomatosa crônica.

Estudos retrospectivos nos Estados Unidos (Angelino et al., 2017), Europa (van den Berg et al., 2009) e América Latina (de Oliveira-Junior et al., 2015) encontraram uma incidência estimada de DGC de 1: 200.000 nascidos vivos por ano. A incidência, embora não seja significativamente diferente entre grupos culturais e étnicos distintos, pode aumentar como resultado de casamentos consanguíneos.

Atualmente, sabe-se que a etiologia da DGC são mutações de perda de função nas subunidades da NADPH oxidase. Estas podem ser constituídas por um distúrbio recessivo ligado ao X (DGC-XR), acometendo o gene *CYBB*, que codifica a proteína *gp91phox*, bem como distúrbios autossômicos recessivos (DGC-AR) nos genes *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* ou *NCF4*, que codificam *p22phox*, *p47phox*, *p67phox* e *p40phox*, respectivamente (**Figura 1**) (Lent-Schochet e Jialal, 2021). Em 2020, a União Internacional de Sociedades Imunológicas (*IUIS*) apontou mutações na proteína transmembranar *CYBC1*, que codifica *CYBC1/Eros* também como um agente causador da DGC, induzindo a expressão reduzida da subunidade principal da NADPH oxidase (*gp91phox*) (Tangye et al., 2020).

**Figura 1.** Visão geral esquemática da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase na membrana plasmática ou fagossomal.



O complexo NADPH oxidase contém duas subunidades, gp91phox e p22phox, formando o citocromo b558, localizado na membrana plasmática ou fagossomal. Após a ativação por estímulos naturais [fagocitose, citocinas e padrões moleculares associados a danos (DAMPs)] ou sintéticos [forbolmiristato-acetato (PMA)], componentes citosólicos, p47phox, p67phox e p40phox, são fosforilados e montados com o citocromo b558 na membrana. Além disso, as proteínas Rac estão associadas à função regulada da NADPH oxidase. O sistema NADPH oxidase ativado transfere um elétron do NADPH para o oxigênio molecular e gera o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que será convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela superóxido dismutase (SOD). Ambas as espécies reativas de oxigênio são essenciais para uma atividade microbicida fagocitária adequada. Fonte: autoria própria.

Cerca de 70% dos casos de DGC registrados nos Estados Unidos são causados pelo genótipo DGC-XR (Winkelstein et al., 2000). Esse tipo de distúrbio resulta na ausência ou quantidade reduzida da gp91phox, proteína hipofuncional ou quantidades normais de uma proteína não funcional (Roos et al., 2010). Mulheres com DGC-XR estão usualmente relacionadas com a inativação do cromossomo X contendo o gene funcional (Anderson-Cohen et al., 2003).

O genótipo de DGC-AR pode ser causado por mutações em genes de proteínas transmembranares p22phox e CYBC1. Menos de 5% dos casos registrados ocorrem por distúrbios na p22phox (Winkelstein et al., 2000). Em pacientes com DGC, a falha na produção

da *p22phox* impede a expressão significativa de *gp91phox* (Ross et al., 2010). O CYBC1 é uma proteína chaperona, que auxilia na dimerização de *gp91phox* e *p22phox*, e sua frequência em pacientes DGC ainda não é conhecida (Tangye et al., 2020). Dentre os poucos relatos de casos envolvendo o gene CYBC1, destaca-se uma coorte islandesa, onde foram encontradas mutações homozigotas associadas a um quadro de doença inflamatória intestinal, suscetibilidade a infecções e explosão respiratória anormal (Arnadottir et al., 2018).

A DGC-AR também pode ser causada por mutações em genes codificadores de proteínas citosólicas *p47phox*, *p67phox* e *p40phox*. Aproximadamente 25% dos pacientes DGC possuem falhas na expressão de *p47phox*, geralmente ocasionada por uma variante em um alelo contendo uma deleção de um par de GT no primeiro limite íntron e exon (Exon 2), levando a uma falha no mecanismo de *splicing* (Kuhns et al., 2019). Essa mutação é acarretada pelo evento de conversão gênica entre o gene *p47phox* com um pseudogene *p47phox*, ambos altamente homólogo (Ross et al., 2006).

A deficiência de *p67phox* está presente em cerca de 5% dos casos de DGC, estando com expressão ausente ou diminuída em quase todos os pacientes afetados (Winkelstein et al., 2000; Ross et al., 2010). Quanto a deficiência da molécula *p40phox*, sua frequência ainda permanece obscura. Dados obtidos a partir de uma coorte de 24 pacientes deficiência em *p40phox* apresentou perda de função bialélica ou mutações hipomórficas (Matute et al., 2009). Além disso, a deficiência de *p40phox* apresenta seu próprio fenótipo clínico. Ao contrário das outras formas de DGC, os pacientes com deficiência de *p40phox* sofrem de doença inflamatória intestinal, mas não de infecções invasivas bacterianas ou fúngicas (van de Geer et al., 2018).

A DGC pode ser diagnosticada por intermédio de métodos de avaliação da atividade da NADPH oxidase, como o ensaio de *nitroblue tetrazolium* (NBT), redução do ferricitocromo-c e ensaios baseados em sondas fluorescentes, como o ensaio de dihidrorodamina (DHR). Este último é considerado padrão ouro pela sua alta sensibilidade e é um teste baseado em fluorescência para detectar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo amplamente utilizado em diagnósticos laboratoriais. No entanto, recomenda-se que, mesmo os resultados alterados obtidos pelo ensaio de DHR sejam confirmados com a análise de mutação genética. Assim, o sequenciamento de genes pode ser usado sem estudos funcionais adicionais para prever o risco relativo de mortalidade e aconselhamento genético, bem como sobre transplante de medula óssea e terapia gênica. O diagnóstico correto e precoce é importante para o tratamento adequado, melhorando assim a qualidade de vida do paciente (Yu et al., 2018).

## 1.2 Manifestações clínicas

Clinicamente, a DGC é bastante variável, havendo relatos de casos desde a infância até a idade adulta tardia. A maioria dos pacientes com DGC apresentam as primeiras manifestações clínicas na infância, sendo diagnosticados nos primeiros 5 anos de idade (van de Geer et al., 2018). Pacientes DGC-XR tendem a apresentar manifestações clínicas mais precoce, além de quadro clínico mais grave quando comparado com DGC-AR, a qual pode ser apresentada na idade adulta. Essa diferença é principalmente associada a produção de EROS por neutrófilos, que é basal em pacientes DGC-XR e residual em pacientes DGC-AR. Assim, a produção de EROS medeia principalmente o efeito do genótipo no fenótipo e tem sido diretamente associada à sobrevivência (Marciano et al., 2015; Yu et al., 2018; Kuhns et al., 2010).

O número de diagnóstico em pacientes na adolescência e idade adulta aumentou significativamente, sendo atribuído ao maior entendimento dos quadros clínicos mais leves, especialmente os de DGC-AR, bem como melhorias de políticas públicas de saneamento básico (Leiding e Holland, 2020).

Os pacientes com DGC possuem susceptibilidade a infecções causadas por microrganismos catalase-positivos, majoritariamente por *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas*, *Serratia marcescens*, *Aspergillus* spp. e fungos do gênero *Norcadia* que ocorrem inicialmente em locais considerados barreiras naturais do organismo e posteriormente acometem órgãos e estruturas profundas, como nos pulmões, nódulos linfáticos, pele, fígado e ossos. As manifestações apresentam-se principalmente em formas de abscessos, (hepáticos e/ou pulmonares), hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenite supurativa, enterite diarreica, osteomielite e septicemia. Outras manifestações clínicas recorrentes são deficiência de crescimento, cicatrização anormal de lesões cutâneas, doença pulmonar crônica e doenças autoimunes. (Roxo-Junior et al., 2014; de Oliveira-Junior et al., 2015; Marciano et al., 2015; Thomsen et al., 2016).

A causa mais comum de óbito em pacientes de DGC é por infecções fúngicas invasivas, destacando-se, *Phaeoacremonium parasiticum*, *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (geralmente *A.nidulans* ou *A.fumigatus*). Raramente, podem apresentar infecções por *Actinomyces* spp. (organismos catalase-negativos) ou metilótrofos (*Granulibacter bethesdensis*, *Acidomonas methanolica* e *Methylobacterium lusitanum*). Linfadenite necrosante ou meningite fatal também foram relatadas como causa de óbito (Reichenbach et al., 2009; Marciano et al., 2015; Falcone et al., 2016).

A tuberculose e o Bacilo *Calmette-Guérin* (BCG) também são importantes causas de infecções em regiões do mundo onde esses organismos são prevalentes ou onde a vacina BCG é administrada rotineiramente no nascimento, sendo um agente infeccioso frequentemente identificado como responsável pelos primeiros sinais clínicos (Conti et al., 2016; Blancas-Galicia et al., 2020). Em pacientes DGC, a inoculação de BCG pode causar manifestações como lesões cutâneas no local de vacinação e disseminação (Nasereddin et al., 2021).

Uma alta incidência de infecções acompanhada por uma resposta hiperinflamatória imprópria pode oferecer riscos de desenvolvimento de linfocitose hemofagocítica (HLH)/síndrome de ativação macrofágica (MAS) a esses pacientes com DGC (Álvarez-Cardona et al., 2012; Wei et al., 2020). Organismos comuns e incomuns encontrados em pacientes com DGC foram listados na **Tabela 1**.

Pacientes com DGC também podem apresentar respostas inflamatórias aumentadas, mesmo na ausência de agentes infecciosos (processo denominado de inflamação estéril), ocorrendo principalmente nos tecidos cutâneos, trato gastrointestinal e trato geniturinário. As manifestações inflamatórias cutâneas mais frequentes na DGC são os granulomas. Outras manifestações inflamatórias associadas foram gengivite, ulceração aftosa, estomatite e ceratoconjuntivite (Goldblatt et al., 1999; Palestine et al., 1983). Pacientes DGC podem apresentar inflamação jejunal, ileal, cecal, retal e perirretal com formação de granulomas semelhantes a doença de Crohn (Ament e Ochs, 1973). Eventos urológicos como obstrução ureteral e estenose do ureter também já foram relatados em pacientes DGC (Walther et al., 1992).

**Tabela 1.** Organismos comuns e tratamentos na infecção na Doença Granulomatosa Crônica.

Categoria	Organismo	Apresentação da infecção								Tratamento
		T	LN	AH	O	P	S	C	G	
Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+			Oxacilina, vancomicina, linezolida, teicoplanina, daptomicina, ceftarolina
	<i>Burkholderia spp.</i> • <i>B. cepacia</i> , <i>B. gladioli</i> , <i>B. pseudomallei</i>		±			+	+			TMP-SMX, meropenem, ciprofloxacina
	<i>Serratia marcescens</i>	+	+		+	+	+			Piperacilina-tazobactam, ciprofloxacina, Carbapenem
	<i>Nocardia spp.</i> • <i>N. asteroides</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. otitidiscaviarum</i> , <i>N. farcinica</i>		±		+	+		+		TMP-SMX, imipenem, linezolida
	<i>Klebsiella spp.</i> , <i>E. coli</i>	+				+	+		+	Cefalosporinas, fluoroquinolona, meropenem, imipenem
	<i>Pseudomonas spp.</i>	+				+	+		+	Piperacilina-tazobactam, cefepima, meropenem, imipenem
	<i>Salmonella spp.</i>	+		+	+		+		+	ciprofloxacina, ceftriaxona, cefixima
Fungo	<i>Aspergillus spp.</i> • <i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. viridinutans</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i>		+		+	+		+		Voriconazol, anfotericina B lipossomal, posaconazol, caspofungina, micafungina
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+	+		+	+	Isoniazida, rifampicina, pirazinamida, Etambutol
	<i>BCG</i>	+	+	+	+	+		+	+	Isoniazida

Abreviaturas: T:tecido mole; LN:linfadenite; AH: abscesso hepático; O:osso; P:pulmão; S:sepsis; C:cérebro; G:gastrointestinal; BCG: *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette – Guérin; TMP-SMX:sulfametoxazol-trimetoprima (Adaptado de Yu, Yang e Chiang, 2021).

### 1.2.2 Hiperinflamação

A inflamação é geralmente definida como um processo fisiológico que visa a manutenção da integridade orgânica frente a patógenos, células danificadas, compostos tóxicos ou irradiação (Chen et al., 2018). Durante o processo inflamatório, a homeostase imunológica é perturbada, levando a respostas coordenadas mediadas pela ativação de vias de sinalização de mediadores inflamatórios (Gaber, Strehl e Buttgerit, 2017).

Habitualmente, a restauração da homeostase do tecido e a resolução da inflamação é realizada por meio de uma rede complexa e precisa de mecanismos regulatórios, caracterizando

uma resposta inflamatória aguda. No entanto, quando não controlada, a inflamação pode se tornar crônica, compondo os distúrbios inflamatórios (Murakami e Hirano, 2012).

Os principais exemplos de distúrbios inflamatórios são as doenças autoimunes, porém respostas excessivas do sistema imunológico também podem ser encontradas em condições de imunodeficiências primárias. Desse modo, pode-se definir o estado de hiperinflamação como episódios inflamatórios, aparentemente espontâneos, relacionado a falhas nos mecanismos de regulação, mediados principalmente pelo sistema imune inato.

Um tema emergente nos últimos anos tem sido o potencial papel das EROS produzidas pela NADPH oxidase como um mecanismo regulador da inflamação. Em humanos, a importância do funcionamento da NADPH oxidase é representada pela DGC, destacando-se as respostas hiperinflamatórias nos quadros de colite crônica (Marciano et al., 2015), cistite granulomatosa (Kontras et al., 1971), abscessos hepáticos e infecções pulmonares causadas por bactérias (Freeman et al., 2011; Leiding et al., 2012). Todavia, a etiologia da hiperinflamação na CGD ainda não foi elucidada.

### **1.3 NADPH oxidase e a resposta imune inflamatória**

A NADPH oxidase consiste em um complexo enzimático localizado na membrana plasmática, em endossomos e fagossomos, sendo altamente expresso em fagócitos (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) e em níveis mais baixos em linfócitos e células endoteliais (Dingjan et al., 2017). Estruturalmente é composto por 5 subunidades proteicas, das quais duas são transmembranares, denominadas *gp91phox* e *p22phox*, e as três demais são os componentes citosólicos *p47phox*, *p40phox*, *p67phox* (Vermot et al., 2021).

Uma vez que a célula é ativada, as subunidades citosólicas são translocadas para a membrana do fagossomo com o auxílio da proteína GTPase Rac, onde se agrupam com *p22phox* e *gp91phox* para formar uma NADPH oxidase funcional (Vermot et al., 2021). Recentemente, a proteína CYBC1, que é uma chaperona, foi descrita como sendo necessária para a expressão do heterodímero *gp91phox* e *p22phox*, entretanto, seu mecanismo de interação com a NADPH oxidase ainda é pouco compreendido (Thomas et al., 2018; Thomas et al., 2019).

A NADPH oxidase atua catalisando a formação do radical livre superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) por meio da transferência de um elétron da NADPH para o oxigênio molecular ( $O_2$ ). O superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) espontaneamente ou pela ação da enzima

superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio é convertido em oxidantes reativos mais potentes, como  $\text{OH}^\cdot$  ou  $\text{HOCl}$ , pela mieloperoxidase (MPO) (Bylund et al., 2010; Vermot et al., 2021).

As EROs produzidas pela NADPH oxidase foram amplamente estudadas nos últimos anos pelo seu papel na ativação da explosão oxidativa de fagócitos, exercendo uma função microbicida, mediada principalmente por neutrófilos e macrófagos, esclarecendo seu papel no sistema imune inato (Segal et al., 2005; Iles e Forman, 2002). Porém, seu papel no sistema imune adaptativo começou a ser considerado há pouco tempo.

Estudos recentes têm destacado as células dendríticas (DCs), um grupo heterogêneo de células responsáveis pela modulação de respostas adaptativas celulares. As DCs apresentam podem interagir direta e indiretamente com linfócitos T, em um processo conhecido como sinapse imunológica. As DCs atuam diretamente pela captura de antígenos, transporte para regiões onde há grandes quantidades de linfócitos T e apresentação desses antígenos para os linfócitos T. Ainda, há uma interação de forma indireta entre DCs e linfócitos T, a qual ocorre pela liberação de citocinas capazes de direcionar a polarização de linfócitos T efetores (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021).

O estado de maturação no qual uma DC se encontra pode influenciar a duração da sinapse imunológica, onde DCs maduras realizam sinapses mais duradouras que DCs imaturas. George-Chandy e colaboradores (2008) relatam que a deficiência de NADPH oxidase pode induzir mudanças no estado de maturação das DCs, o que pode impactar na indução da resposta das células T. Entretanto, não são bem compreendidas as consequências da falha da NADPH oxidase de DCs na expressão de moléculas coestimuladoras, apresentação de antígenos para linfócitos T e produção de citocinas.

Quanto a diferenciação de linfócitos T, a ação das EROs na modulação do fenótipo T  $\text{CD4}^+$  (Th1/Th2/Th17/Threg) também não é elucidada (Cachat et al., 2015). No entanto, relatos apontam que os fenótipos pró-inflamatórios Th1/Th17 parecem ser favorecidos.

### **1.3.1 Papel das células dendríticas na inflamação**

As células dendríticas (DCs) compreendem células da resposta imune inata que estão relacionadas com a orientação da resposta imune adaptativa, sendo responsável pela interação desses dois sistemas. As DCs são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs),

sendo especializadas na instrução dos linfócitos T *naïve* em linfócitos efetores. Assim, as DCs reconhecem, processam e apresentam antígenos, fornecendo os sinais para ativação eficaz de linfócitos T (Zanna et al., 2021).

Além disso, as DCs desempenham outras funções na imunidade do hospedeiro, induzindo respostas inatas pró-inflamatórias, ativando e induzindo linfócitos T *naïve* e de memória, além de linfócitos B. As DCs também possuem atividade tolerogênica, uma vez que, na ausência de inflamação, atuam apresentando antígenos próprios para linfócitos T, instruindo-os a um fenótipo regulador (Iberg e Hawiger, 2020). Portanto, as DCs controlam respostas imunes, sendo consideradas como um ponto de controle e regulação da resposta adaptativa.

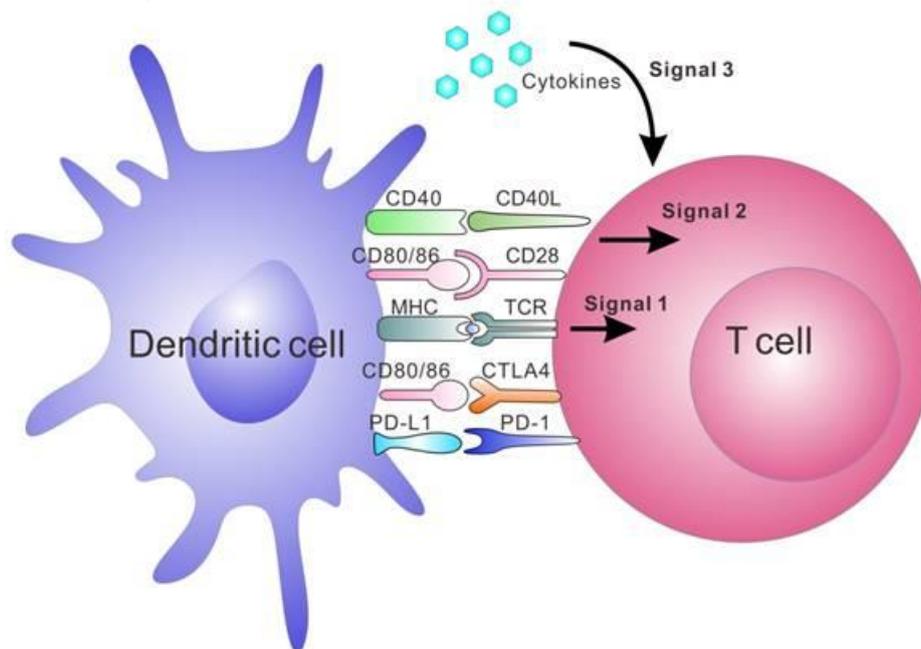
As DCs são consideradas um grupo de células sentinelas no sistema imunológico, sendo derivadas de células precursoras na medula óssea e migrando para diferentes regiões do organismo, formando um sistema celular amplamente distribuído por todo o corpo, incluindo sangue periférico, superfícies mucosas, tecidos linfoides (como baço, timo e linfonodos) e tecidos não linfoides (fígado e rins) (Rehman et al., 2017). Nesses locais, as DCs completam seu processo de diferenciação, entretanto ainda permanecem imaturas, apresentando baixa expressão de MHC-II e moléculas coestimuladoras, como CD80, CD86 e CD40 (Carenza et al. 2019).

Quando a homeostase do sistema imune é perturbada, as DCs atuam por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que compreendem moléculas indutoras de fagocitose, como receptores do sistema complemento CR3 (CD11b / CD18), CR4 (CD11c / CD18), o receptor de lectina do tipo C, DC-SIGN (CD209) e DEC-205 (CD205); e moléculas de sinalização celular, como receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR) e receptores tipo RIG (RLR) (CAO, 2016; Durai e Murphy, 2016). Esses podem ser ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), danos (DAMPs) ou alterações de homeostase (HAMPs) (Liston e Masters, 2017; Qian e Cao, 2018).

Em um processo infeccioso, uma vez que os PRRs foram ativados, ocorre a fagocitose do microrganismo e mais complexos de NADPH oxidase são recrutados para a membrana fagossomal, trafegando por vesículas e produzindo EROs no lúmen do fagossomo (Elsen et al., 2004; Dingjan et al., 2017). As EROS atuam induzindo a morte dos microrganismos ingeridos, retardando a quebra do antígeno e alterando o repertório de peptídeos (Rybicka et al., 2012; Allan et al., 2014). Assim, em células dendríticas, a NADPH oxidase também modula o repertório de antígenos para apresentação às células T.

As DCs migram para o linfonodo e passam por um processo de maturação, marcado pela perda da habilidade de captação de antígenos e ganho da função de apresentação de antígeno (Hilligan e Ronchese, 2020). As DCs aumentam a expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e II (MHC-I e MHC-II) em sua superfície celular ligados a peptídeos antigênicos, bem como moléculas coestimulatórias, como CD80/86 e CD40 em sua superfície celular (Steinman e Young, 1991). A combinação dos sinais peptídeo:MHC e moléculas coestimulatórias regula a especificidade e magnitude da resposta das células T. As DCs maduras podem secretar uma gama de citocinas imunoestimulantes capazes de influenciar fortemente o fenótipo dos linfócitos T efetores (Kalinski et al., 1999; De Jong e Smits, 2005). As citocinas mediadoras de respostas pró-inflamatórias são a IL-12, relacionada a polarização de linfócitos Th1, ao passo que as IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23 e IL-1 $\beta$  polarizam linfócitos Th17 (Schraml, Reis e Sousa, 2015).

**Figura 2.** Principais interações realizadas durante a sinapse imunológica e os três sinais que induzem a ativação e diferenciação de linfócitos T.



O primeiro sinal consiste na apresentação de antígenos pela interação MHC-peptídeo e o TCR. O segundo sinal é a coestimulação. O terceiro sinal é gerado pela liberação de citocinas (Adaptado de Wang et al., 2017).

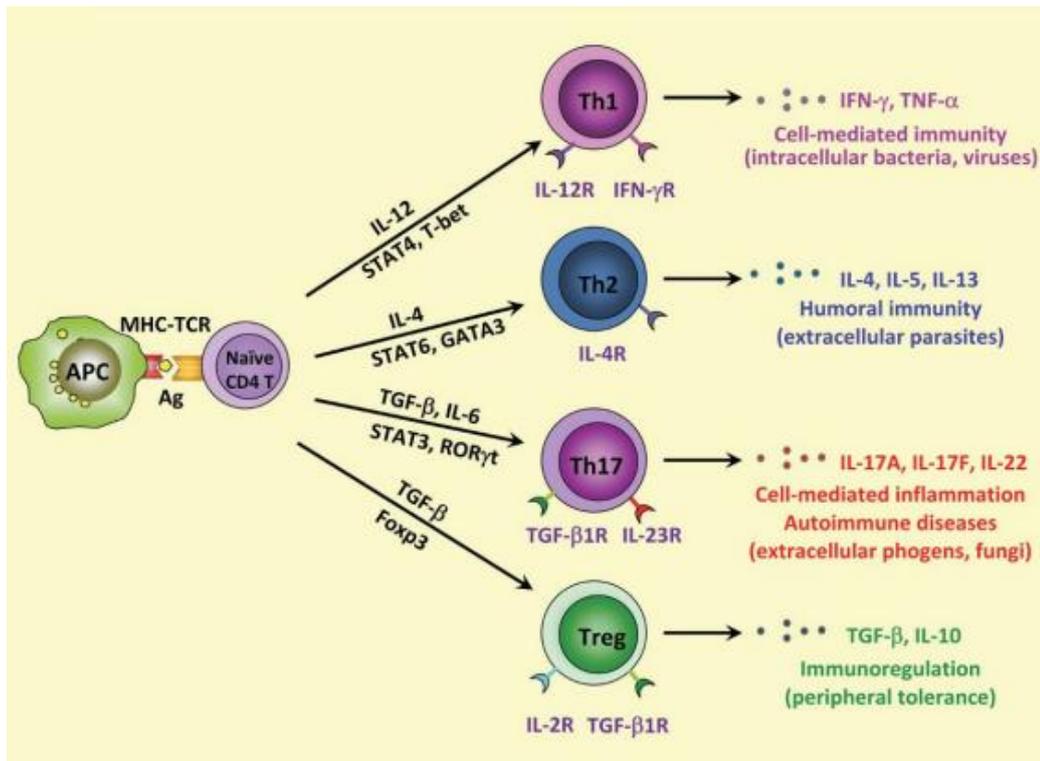
### 1.3.2 Respostas pró-inflamatórias linfocitárias: Th1 e Th17

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> desempenham funções efetoras importantes na resposta imune, bem como um papel crucial nos processos inflamatórios. A primeira etapa na diferenciação dos linfócitos T *naïve* consiste na estimulação antigênica, resultando da interação do TCR e do CD4<sup>+</sup> como o complexo antígeno-MHC II das células dendríticas (Lilligan e Ronchese, 2020). A ativação do TCR acoplado a CD3 induz a ativação de vias de sinalização a jusante, que levam a proliferação e diferenciação dos linfócitos T *naïve* em células efetoras. A polarização do linfócito efetor depende do meio de citocinas, bem como da concentração de antígenos e moléculas coestimulatórias (Kreileder et al., 2021).

A fonte inicial de citocinas são as APCs, bem como outros membros das células imunes inatas. Posteriormente, algumas das citocinas produzidas pelas células em diferenciação podem criar um ciclo de feedback positivo, pelo qual a diferenciação e a resposta são ligeiramente aumentadas. As respostas pró-inflamatórias são mediadas por linfócitos Th1 e Th17 (Kamali et al., 2019).

Linfócitos Th1 são caracterizados pela produção de IFN- $\gamma$ , citocina que promove ativação de monócitos, levando ao aumento da produção de citocinas inflamatórias e da expressão de MHC de classe II (Abebe et al., 2019). Outro tipo de resposta inflamatória é ocasionado pelas células Th17, assim denominadas devido a produção de IL-17, que têm como alvo células do sistema imunológico inato e células epiteliais. Nestas células, a IL-17 induz a produção de G-CSF e IL-8, que levam ao aumento da produção e recrutamento de neutrófilos, respectivamente (Miossec e Kolls, 2012). A produção de GM-CSF e IL-22 também são moduladas por células Th17, induzindo a produção de granulócitos e monócitos na medula óssea e células epiteliais de tecidos de barreira, como a pele, intestino e pulmão, para melhorar a defesa antimicrobiana e a integridade da barreira epitelial (Weaver et al., 2013).

**Figura 3.** Modelo para diferenciação de linfócitos T CD4+ *naive*.



Nesta figura destacamos que na presença de IL-12, a diferenciação de células T CD4+ *naive* em células Th1 requer a ativação do fator de transcrição regulador mestre T-bet através de STAT1 e STAT4. As células Th1 produzem IFN-γ e estão envolvidas na imunidade mediada por células contra bactérias e vírus intracelulares. A combinação de TGF-β e citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-23, conduz a diferenciação de células T CD4+ virgens em células Th produtoras de IL-17 (Th17) através da regulação de STAT3 e RORγt. As células Th17 desempenham um papel crítico na proteção do hospedeiro contra patógenos extracelulares e em doenças autoimunes inflamatórias (Miossec e Kolls, 2012).

Muitas doenças inflamatórias crônicas são caracterizadas por respostas inadequadas ou desreguladas das células T CD4+. Desse modo, estudos descreveram o aumento da resposta Th17 em casos de inflamação crônica em doenças autoimunes, como doença de Chron, asma e psoríase (Miossec e Kolls, 2012).

As EROs também vem sendo apontadas como agentes importantes na diferenciação de linfócitos T, favorecendo os fenótipos pró-inflamatórios Th1 / Th17. Horváth e colaboradores (2011) documentam níveis aumentados de IL-23, IL-17 e IL-21, aumento de células Th17 e baixos níveis de IFN-γ em células de pacientes DGC estimuladas com PMA+ionomicina, indicando um desequilíbrio na resposta Th1/Th17 em pacientes com DGC.

A ativação excessiva do eixo Th17 pode potencializar a formação de granuloma e provavelmente desempenhar um papel na patogênese de doenças autoimunes em pacientes com DGC, notadamente doença inflamatória intestinal (Horváth et al., 2011).

A etiologia exata da hiperinflamação na CGD ainda permanece obscura. Dessa forma, este estudo se propõe a investigar a hipótese de que células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com DGC, devido ao defeito no funcionamento da NADPH oxidase, apresentam alterações na produção de citocinas bem como com o comprometimento da apresentação de antígenos a linfócitos T CD4+, levando ao desequilíbrio na geração Th1/Th17.

Compreender melhor a comunicação entre imunidade inata e adaptativa em pacientes DGC é um passo fundamental para identificar novos alvos terapêuticos, imunomoduladores e elucidar novos mecanismos de proteção da resposta imune nos pacientes com DGC.

## **2 OBJETIVOS**

---

## 2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial de apresentação de antígenos por células dendríticas de pacientes com DCG e a indução dos perfis de linfócitos T auxiliar (Th).

## 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a clínica da coorte de pacientes DGC;
- Investigar a genética dos pacientes DGC por Sanger e WES;
- Avaliar a expressão de moléculas de superfície em mo-DC estimuladas com LPS, *Candida albicans* e BCG;
- Avaliar a secreção de citocinas em culturas de mo-DCs e coculturas de mo-DCs com linfócitos T;
- Avaliar expressão de moléculas de superfície em linfócitos T cocultivados com mo-DCs estimuladas com LPS, *Candida albicans* e BCG.

## **3 METODOLOGIA**

---

### 3.1 Casuística

O estudo utilizou amostras de sangue periférico, sendo 20 mL coletados em tubo contendo heparina sódica e 2 mL em tubo contendo EDTA. A coorte do presente estudo foi composta por 11 pacientes de DGC dentre faixa etária de 1,6 a 19 anos de idade, sendo 7 do sexo masculino e 4 do sexo feminino. Os pacientes que foram cordialmente convidados a participarem do estudo apresentavam alteração da explosão respiratória pelo ensaio bioquímico de DHR, além de clínica sugestiva de DGC conforme indicado pela Fundação Jeffrey Model.

Eventos de infecção ativa e/ou neoplasia, insuficiência renal ou hepática, pacientes portadores do vírus HIV ou tratados com imunossupressores; além daqueles com diagnóstico laboratorial incidental de imunodeficiência primária com predominância de defeitos de anticorpos, sem história de infecções de repetição severas foram usados como critério de exclusão e não inclusão.

Pareadas com as amostras dos pacientes, foram coletadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis não parentais aos pacientes para compor o grupo controle, a fim de serem mantidas as condições de coleta, armazenamento e transporte das amostras dos dois grupos. O grupo controle foi composto por indivíduos de idade igual ou superior a 18 anos, que não possuem diagnóstico de HIV/AIDS, nem apresentam infecções, doenças autoimunes ou inflamatórias; tampouco fazem uso de medicamentos. Foram avaliados 11 indivíduos saudáveis, sendo 5 (cinco) do sexo masculino e 6 (seis) do sexo feminino, com idades entre 23 e 30 anos.

Os pacientes menores de idade estavam devidamente acompanhados de seus responsáveis no momento da coleta, a qual ocorreu após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto de pesquisa, o protocolo experimental e os TCLEs utilizados contemplaram os quesitos éticos aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-ICB/USP (**Anexo A**).

### 3.2 Investigação genético-molecular

#### 3.2.1 Obtenção das amostras de DNA genômico (gDNA)

O DNA genômico foi extraído a partir de 2mL de sangue total (coleta em tubo de EDTA, BD Vacutainer) com o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade e qualidade das amostras foram estimadas com o

espectrômetro NanoDrop 2000/2000c™ (Thermo Fischer, EUA), no comprimento de onda 260nm. A integridade do DNA foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1% (TRIS 0,004M, EDTA 0,001, Ácido acético glacial, pH 8,0) com configuração de 100V, 400A por 45 min. As amostras de DNA foram adicionadas a 200ng/μL no gel juntamente com *SYBR safe* (Invitrogen, EUA). Como padrão de peso molecular foi utilizado low mass DNA ladder (Thermo Fisher, EUA).

### 3.2.2 Sequenciamento do exoma completo (WES)

O sequenciamento foi realizado no sistema NovaSeq™ 6000 (Illumina, EUA). Todo o procedimento foi realizado pelo Centro de Estudos Sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL) da Universidade de São Paulo (USP). Os arquivos foram disponibilizados em formato fastq, BAM, bem como um arquivo no formato “.xlsx” contendo o alinhamento, identificação de variantes e anotações de SNPs e indels. Variantes com cobertura igual ou menor a 10 *reads* (leituras de uma base) ou uma qualidade de SNP em escala Phred menor ou igual a 30 foram desconsideradas.

A filtragem de variantes foi realizada a partir do arquivo “.xlsx” contendo o alinhamento, identificação de variantes e anotações de SNPs e indels. Foram selecionadas variantes com base em qualidade (CADD Phred score  $\geq 15$ ), frequência alélica na amostra e tipos de mutação, quanto mutações não sinônimas (*missense*), mutações sem sentido (*nonsense*), mutações que afetam o processamento do mRNA (*splicing*) e mutações de mudança de quadro de leitura (*frameshift*) causadas por inserções ou deleções (*indels*) que envolvem o número de pares de base que não é múltiplo de três.

A patogenicidade das variantes foi avaliada *in silico* pelos algoritmos *Mutation Tester* (<http://www.mutationtaster.org/>), PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>).

As variantes foram avaliadas em diferentes bancos de dados públicos de frequência populacional como gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), ABraOM (<https://abraom.ib.usp.br/>) e 1000Genomes (<https://www.internationalgenome.org/>). Foi verificada a presença das variantes em bancos de dados clínicos como ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e OMIM (<https://www.omim.org/>).

### 3.2.3 Sequenciamento de Sanger

Foram realizadas amplificações por PCR convencional e purificação com ExoSAP-IT™ (Applied Biosystem, EUA) e enviadas para o serviço terceirizado CEGH-CEL, USP. As amostras foram disponibilizadas no formato “.ab1” e analisadas no software BioEdit (Tom Hall Ibis Therapeutics).

As sequencias obtidas foram comparadas com as sequencias disponibilizadas nos bancos de dados RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) e Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).

## 3.3 Investigação da hiperinflamação em pacientes DGC

### 3.3.1 Isolamento de monócitos e linfócitos T *naïve* a partir de *PBMC*

As células mononucleares do sangue periférico (*PBMC*) foram isoladas a partir de 20 mL de sangue total (coleta em tubo BD Vacutainer com heparina) de indivíduos saudáveis, sendo obtidas por centrifugação em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Suécia). O sangue foi diluído em PBS na razão de 1:1 e adicionado lentamente a tubos cônicos de 15 mL contendo 1/3 do volume total de Ficoll-Paque PLUS. Em seguida, o tubo foi submetido à centrifugação por 20 minutos a 600g. O anel linfocitário foi retirado com pipeta de transferência e lavado uma vez com solução salina, centrifugando-se por 10 minutos a 600g e ressuspendida em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado 10% com SFB e 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco, USA).

Procedeu-se a determinação do número de células pela contagem em câmara hemocitométrica modelo Neubauer (KASVI) sendo avaliada a viabilidade celular com azul de tripan 0,4% (Merck Millipore, Alemanha).

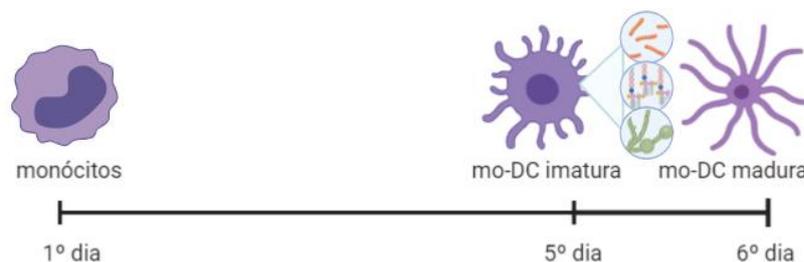
O isolamento dos monócitos clássicos, não-clássicos e intermediário, a partir da suspensão celular, foi realizado com o *Human Pan Monocytes Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Alemanha), ao passo que os linfócitos T *naïve* foram isolados com *Human T Naïve Pan T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Alemanha), ambos seguindo as recomendações do fabricante. Os procedimentos foram realizados com colunas magnéticas *LS Columns* (Miltenyi Biotec, Alemanha) por seleção positiva para a obtenção dos monócitos marcados com as microesferas magnéticas e seleção negativa para obtenção dos linfócitos T *naïve*. Os linfócitos foram congelados para realização do ensaio de cocultura.

Os linfócitos T *naïve* foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , contendo  $1 \cdot 10^6$  células em 1mL de SBF com 10% de DMSO em tubo criogênico. Para descongelamento, as células foram acondicionadas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  e rapidamente transferidas para tubo estéril com 10mL de meio de cultura e lavadas uma vez com RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. As células foram centrifugadas por 6 minutos a 500g. Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram mantidas em garrafa de cultura por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e sob tensão de 5% de  $\text{CO}_2$ , para recuperação do metabolismo. A viabilidade das células foi realizada por ensaio de exclusão colorimétrica com azul de tripan (0,04%), semelhante ao descrito no tópico 3.3.5.

### 3.3.2 Diferenciação e maturação de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs)

Após a separação, os monócitos foram distribuídos em placas de 24 poços ( $2 \cdot 10^5$  células/poço) e foram cultivados em 500mL de meio RPMI acrescido com 50 ng/mL de Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófago (GM-CSF; PeproTech, EUA) e 50 ng/mL de Interleucina 4 (IL-4; PeproTech, EUA), a fim da diferenciação em mo-DCs imaturas. Os monócitos foram acondicionados em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$  por 5 dias. No quinto dia, as mo-DCs imaturas foram estimuladas com BCG (5:1 MOI), LPS (100ng/mL) e *Candida albicans* (2:1 MOI), exceto controle negativo, o qual não foi estimulado. As células foram incubadas por mais 24 h para maturação (**Figura 4**).

**Figura 4.** Diferenciação e maturação de células dendríticas derivadas de monócitos.



Monócitos foram diferenciados em células dendríticas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina e estreptomicina, 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4, sendo obtidas no 5º dia de cultura mo-DCs imaturas. As mo-DCs imaturas foram estimuladas com BCG (5:1MOI), LPS (100ng/mL) e *Candida albicans*(2:1MOI) por 24h para maturação. Fonte: autoria própria.

A *Candina albicans* foi cultivada em meio caldo Sabouraud sob agitação a  $37^{\circ}\text{C}$ , overnight. Findado o período de cultura, centrifugou-se a 900g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e a *Candida albicas* foi ressuspendida em 1 mL de meio RPIM para contagem

do número de leveduras em câmara hemocitométrica. A *C.albicans* na morfologia de hifas foram inativadas em banho-maria a 70°C por 1 hora e então utilizadas para pulsar as mo-DCs imaturas.

A BCG utilizada neste estudo pertence a cepa Moreau RJ, encontrando-se armazenadas -80°C em meio RPMI para uso. Os bacilos foram previamente cultivados em meio líquido Middlebrook 7H9 ou meio sólido Middlebrook 7H10, suplementados respectivamente com 10% de ADC mais 0,05% de Tween-80 e 10% de OADC; inativados em banho-maria a 70°C por 1 hora e armazenados em meio RPMI para uso.

### 3.3.4 Avaliação fenotípica de mo-DC imaturas e maduras

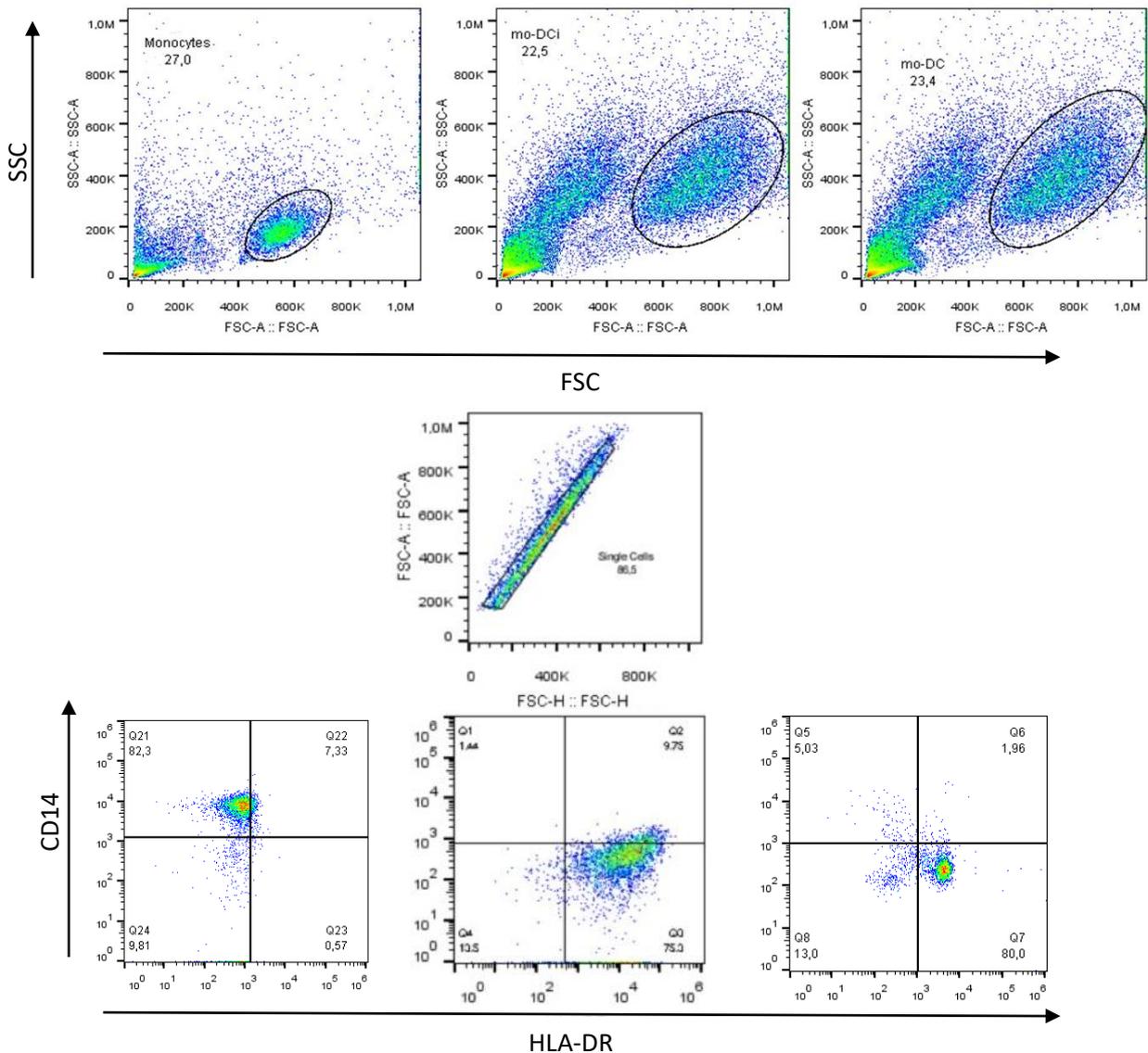
Foram avaliados o perfil fenotípico de monócitos, mo-DC e mo-DC maduras. Os monócitos foram obtidos após 3 horas de aderência na placa, ao passo que as mo-DC imaturas e mo-DC estimuladas foram obtidas no 5º e 6º dia de cultura, respectivamente. As células foram retiradas da placa através da adição de meio RPMI gelado e *scraper*. Em seguida foram centrifugadas por 10 minutos a 600g e ressuspendidas de modo a se ter  $8 \cdot 10^4$  células em 500mL de PBS.

A marcação foi realizada em um painel, sendo adicionados os anticorpos e então incubados por 15 minutos a temperatura ambiente protegido da luz. No primeiro foram adicionados 3µL de CD14-(PercP-Cy5.5); 0,3µL de CD11c-BV605; 0,75µL de CD1a-BV421; 1µL de HLA-DR-APC; 0,3µL de CD83 PE-Cy7; 0,2µL de CD40-BV711; 1µL de CD80-PE, 0,75µL de CD86 BV510 (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Painel de anticorpos para marcação de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos.

	<b>anticorpos</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Canal</b>	<b>Clone</b>	<b>Empresa</b>
<b>Painel</b>	CD14	PercP-Cy5.5	BL3	M5E2	BD Biosciences
	HLA-DR	APC	RL1	L243	BD Biosciences
	CD11c	BV605	VL3	S-HCL-3	BD Biosciences
	CD1a	BV421	VL1	HI149	BD Biosciences
	CD83	PE-Cy7	BL4	HB15e	BD Biosciences
	CD80	PE	BL2	L307.4	BD Biosciences
	CD86	BV510	VL2	2331	BD Biosciences
	CD40	BV711	VL4	5C3	BD Biosciences

**Figura 5.** Representação gráfica da estratégia de análise utilizada na caracterização da expressão de marcadores extracelulares em monócitos, mo-DCs imaturas e mo-DCs maduras.



Primeiramente foram selecionadas as populações de monócitos ou mo-DCs segundo o tamanho e granulosidade característicos dessas células (A), seguido da exclusão de doublets (B) e delimitação das populações com base na expressão de CD14 e HLA-DR dentro dos gates single cells (C). No caso dos monócitos, gate CD14+HLA-DR- e, no caso das mo-DCs imaturas e maduras, gate para CD14-HLA-DR+, nos quais as análises fenotípicas foram realizadas. Fonte: autoria própria.

A avaliação imunofenotípica foi realizada com base na expressão do MFI dessas moléculas de superfície por citometria de fluxo Attune™ (ThermoFisher Scientific). Foram adquiridos no mínimo 10.000 eventos de uma população celular determinada segundo suas características de tamanho e granulosidade, excluindo-se a região de linfócitos e células mortas.

Para análise dos monócitos e células dendríticas, em gráfico de tamanho (*FSC-forward scatter*) por granulosidade (*SSC-side scatter*), delimitou-se por um *gate* a população que

possuía esses parâmetros característicos dos monócitos e dentre as células presentes. A partir da população selecionada, os parâmetros FSC-A/FSC-H foram aplicados, de maneira a eliminar os *doublets* (células que passam unidas através do laser e são reconhecidas como um único evento), e se obteve 86% de células únicas (*single cells*) (Figura 4B). A partir dessa população, a expressão das moléculas CD14 e HLA-DR foi analisada, na qual células expressando o fenótipo CD14-HLA-DR+, característico de mo-DCs imaturas diferenciadas a partir de monócitos, representadas no quadrante Q3, atingiram uma porcentagem de 75% de células diferenciadas.

### 3.3.5 Viabilidade celular por exclusão colorimétrica com azul de tripan 0,4%

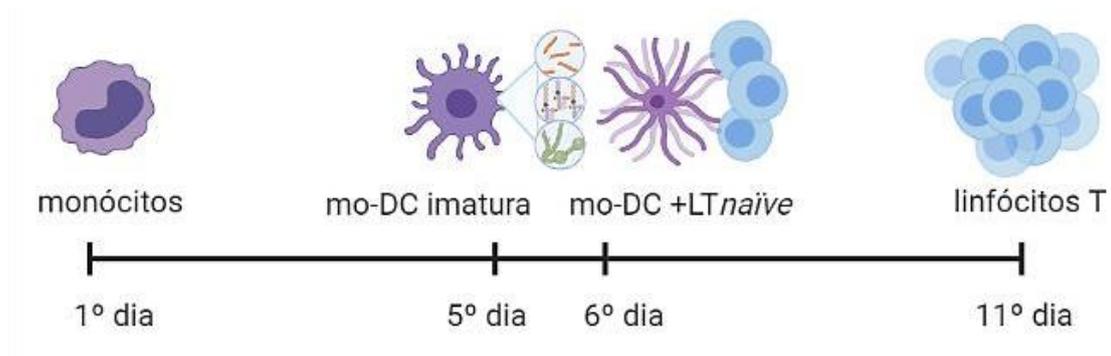
Monócitos, mo-DC imaturas e mo-DC estimulados foram coletadas e centrifugadas a 600g por 10 minutos e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI. Em 90µL de suspensão celular foi adicionado 10µL de azul de tripan, deixou-se reagir por 3 minutos e foi feita a contagem de 400 células (vivas ou mortas) em câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Células viáveis(\%)} = \frac{\text{número total de células viáveis /mL}}{\text{total de número de células/mL}} \cdot 100$$

### 3.3.6 Avaliação do perfil fenotípico de linfócitos T co-cultivados com mo-DCs

Para a avaliação fenotípica, linfócitos T *naïve* cocultivados por 5 dias com mo-DCs estimuladas com BCG (5:1 MOI), LPS (100 ng/mL) e *Candida albicans* (2:1 MOI) na proporção de 5:1. Os linfócitos foram coletados da placa de cultura pela adição de meio de meio RPMI. Em seguida foram centrifugados por 10 minutos a 600g e ressuspensas de modo a se ter  $2,5 \cdot 10^5$  células em 500mL de PBS.

**Figura 6.** Cocultura de linfócitos T com células dendríticas derivadas de monócitos.



Monócitos foram diferenciados em células dendríticas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina e estreptomicina, 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4, sendo obtidas no 5º dia de cultura mo-DCs imaturas. As mo-DCs imaturas foram estimuladas com BCG (5:1MOI), LPS (100ng/mL) e *Candida albicans*(2:1MOI) por 24h para maturação. No 6º dia, foram adicionados 10 linfócitos T *naïve* para cada 1 mo-DCs, sendo cocultivados por 5 dias. Os linfócitos T foram previamente marcados com CellTrace™ Violet para avaliação de linfoproliferação e no 11º dia foram avaliados com marcadores de diferenciação celular. Fonte: autoria própria.

A marcação fenotípica foi realizada conforme o painel da **tabela 3**. Os tubos foram incubados durante 10 min. a 37°C. Após, acrescentou-se 2mL de tampão de lise (RBC Lysis Solution - QIAGEN). Os tubos foram homogeneizados e incubados durante 10 min a 37°C, centrifugando-os novamente. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS suplementado com SFB 1%. Após a lavagem adicionou-se 1mL de tampão Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) em todos os tubos, incubando-os durante 30 min. a 4°C. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. Foram adicionados a cada tubo 3 µL de anti CD3- FITC; 2 µL de CD4-BV605; 4 µL de CD8- BV421; 1,2 µL de CCR7-Pacific Green; 1,5 µL de CD45RA- Pe-Cy7; 10 µL de RORγT- PE; 12 µL de STAT-4 -PerCP-Cy 5.5; 8 µL de STAT-3- APC e 10 µL de T-BET- BV711. Os tubos foram incubados por mais 30 min. à TA, protegido da luz. As células foram lavadas e ressuspensas em 500µL de CellFIX (BD Biosciences). (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Painel de anticorpos para marcação de linfócitos T cocultivados com mo-DCs.

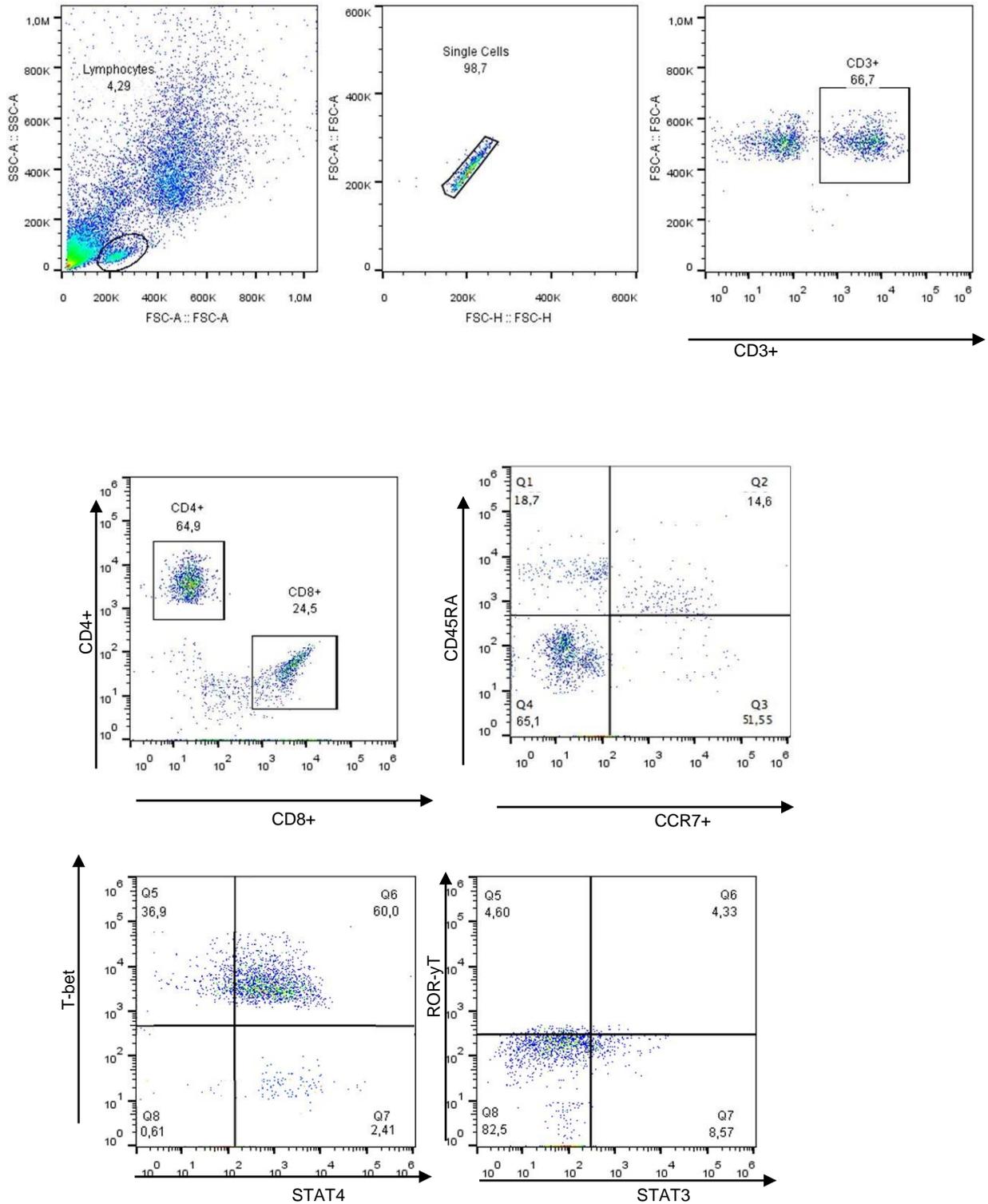
	<b>anticorpos</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Canal</b>	<b>Clone</b>	<b>Empresa</b>
	CD3	FITC	BL1	HIT3a	BD Bioscience
	CD4	BV605	VL3	RPA-T4	BD Bioscience
	CD8	BV421	VL1	3B5	Thermo Fisher
	CCR7	Pacific Green	VL2	G043H7	BioLegend
<b>Painel</b>	CD45RA	Pe-Cy7	BL4	EBio4B10	BD Bioscience
	ROR $\gamma$ T	PE	BL2	Q21-559	BD Bioscience
	STAT-4	PerCP-Cy 5.5	BL3	38/p-Stat4	BD Bioscience
	STAT-3	APC	RL1	M59-50	BD Bioscience
	T-BET	BV711	VL4	O4-46	Thermo Fisher

A avaliação imunofenotípica foi realizada com base na expressão do MFI dessas moléculas de superfície por citometria de fluxo Attune (ThermoFisher Scientific).

Foram adquiridos 10.000 eventos de uma população celular determinada segundo suas características de tamanho e granulosidade, excluindo-se a região de linfócitos e células mortas.

A análise dos dados da citometria foi dada pela determinação da população de linfócitos pelo tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A) característicos de coculturas, criando-se o *gate* de linfócitos. Dentro desse *gate* fez-se um segundo *gate* de tamanho selecionam área por altura, caracterizando as chamadas *single cells* (FSC-H x FSC-A), excluindo células que porventura tenham passado juntas na frente do laser e tenham sido lidas como um evento único. As células foram separadas baseados nos marcadores característicos linfócitos T auxiliares (CD3+CD4+) e T citotóxicos (CD3+CD8+). Dentro da população CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, foram determinados os estágios de maturação celular em T *naïve* (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) e efetores (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>). Por fim, dentro da subpopulação efetora foram avaliadas células diferenciadas em Th1(T-bet<sup>+</sup>STAT-4<sup>+</sup>) e Th17 (ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> STAT-3<sup>+</sup>).

**Figura 7.** Estratégia de análise de imunofenotipagem de linfócitos T *naïve* cocultivados com mo-DCs.



Dotplots de tamanho (FSC-A) por complexidade (SSC-A) com a subpopulação característica de linfócitos (A); marcação da população de linfócitos T, CD3+ (B); diferenciação das populações CD4+ e CD8+ dentro de CD3+ (C); separação das subpopulações *naïve* e efectoras caracterizadas por presença ou ausência dos marcadores CD45RA e CCR7, no dotplot representativo de CD3+CD4+ apenas, em que Q2 corresponde as células T *naïve*, Q4 às células efectoras. Dentro de Q4(células efectoras), foram definidas as subpopulações Th1(Q6) para células expressando T-bet e STAT-4 e Th17(Q6) para células positivas para os marcadores ROR $\gamma$ -T e STAT-3. Fonte: autoria própria.

### 3.3.7 Dosagem de citocinas

A produção de citocinas é um dos mais importantes fatores de regulação da resposta inflamatória. Assim, foi avaliada a expressão de IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 no sobrenadante da cultura de mo-DCs imaturas e ativadas com BCG (5:1 MOI), LPS (100 ng/mL) e *Candida albicans* (2:1 MOI) obtido no quinto dia para avaliação de mo-DCs imaturas e 6º dia para mo-DCs ativadas.

Ainda, foi avaliada a expressão de IL- 17A, IFN- $\gamma$  e IL-6 em sobrenadante de coculturas de linfócitos T *naïve* cocultivados por 5 dias com mo-DCs estimuladas com BCG (5:1 MOI), LPS (100 ng/mL) e *Candida albicans* (2:1 MOI) obtido no 5º dia de cocultura.

Para as dosagens foi utilizada a técnica de ELISA específica para cada citocina, seguindo-se recomendações do fabricante, com os resultados expressos em pg/mL (**tabela 4**).

**Tabela 4.** Citocinas quantificadas em ensaios de cultura de mo-DCs e cocultura de mo-DCs com linfócitos T.

Ensaio	Citocina	Kit	Fabricante
<b>mo-DC</b>	IL-12p70	BD OptEIA™	BD Bioscience
	TNF- $\alpha$	BD OptEIA™	BD Bioscience
		BD OptEIA™	BD Bioscience
	IL-10	BD OptEIA™	BD Bioscience
<b>LT+ mo-DC</b>	IL- 17A	BD OptEIA™	BD Bioscience
	IFN- $\gamma$	BD OptEIA™	BD Bioscience
	IL-6	BD OptEIA™	BD Bioscience

mo-DC: cultura de células dendríticas imaturas e maduras; LT + mo-DC: cocultura de linfócitos T com mo-DCs ativadas com BCG, LPS e *C.albicans* .

### 3.3.8 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados não paramétricos, foram avaliados por teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. Os dados foram expressos como média com desvio padrão. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, a probabilidade de  $p < 0,05$  capaz de revelar a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os dados dos diferentes grupos. Todas as análises foram realizadas no Software Prisma 8.00 (GraphPadSoftawer Inc.).

## **4 RESULTADOS**

---

#### 4.1 Análise clínica e laboratoriais dos pacientes DGC

O presente estudo foi realizado a partir de amostras coletadas de 11 pacientes diagnosticados com DGC, todos apresentando quadro clínico sugestivo da doença e alteração da explosão respiratória avaliada pelo ensaio de DHR (**Tabela 5**). As amostras tiveram diferentes procedências, 3 pacientes oriundos do estado Ceará, 2 de São Paulo e 6 do Rio de Janeiro.

O grupo de pacientes analisados é composto por 7 meninos (63,64%) e 4 meninas (36,36%), com apresentação da primeira manifestação clínica entre 28 dias e 14 anos de idade, sendo diagnosticados entre 1 ano e 18 anos após a primeira manifestação.

As manifestações clínicas mais comuns foram: abscessos(n=10), pneumonia (n=6), sendo de repetição em 3 pacientes; amigdalite (n=4), IVAS (n=4) e diarreia (n=4). Outras manifestações foram infecções do trato urinário (n=2), hiperplasia do linfonodo (n=2), otite (n=1), granuloma vocal (n=1), sinusite de repetição (n=1), piodermite de repetição (n=1), sepse (n=1), osteomielite (n=1).

Abscessos em diferentes formas revelou-se a causa mais comum de patologia infecciosa e não infecciosa, ocorrendo em 72,73% dos pacientes, abscesso hepático foi o mais frequente, sendo ainda relatado abscesso cerebral, coxa, região inguinal, cervical, cutâneo, subungueal, amigdaliano. Na maioria dos casos, esses abscessos recorrentes necessitaram ser drenados cirurgicamente (54,54%) tendo baixa resposta ao tratamento com antibióticos.

Na DGC, infecções múltiplas e recorrentes ocorrem por uma variedade de microrganismos. De acordo com número de microrganismos isolados (n=5), duas compreendem bactérias gram-positivas (*Streptococcus pneumonia* e *Staphylococcus aureus* e duas gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Chromobacterium violaceum*) e um fungo (*Aspergillus fumigatus*).

Todos os pacientes foram vacinados com a BCG conforme preconizado no cartão vacinal do Ministério da Saúde. Apenas um paciente (P8) apresentou BCGite na forma disseminada, havendo ulceração e secreção da cicatriz de BCG com 3 mês de idade e resposta clínica satisfatória ao tratamento antimicobacteriano.

Os pacientes **P4** e **P5** encontram-se em espera de transplante de medula óssea (TMO). Todos os pacientes recebem tratamento profilático com sulfametoxazol-trimetoprima ou Itraconazol.

**Tabela 5.** Caracterização clínica dos pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC).

Paciente	sexo	Idade	Consanguinidade	1ª manifestação clínica	Idade do diagnóstico	Infecções	Manifestações clínicas	Tratamento
<b>P1</b>	F	19a7m	N	2a	18a6m	-	ITU de repetição; sinusite de repetição; piodermite de repetição; abscesso cerebral com meningite associada	itraconazol; sulfametoxanol + trimetoprima; ácido fólico
<b>P2</b>	M	1a3m	S	1a8m	11a	<i>S. aureus</i>	abscessos hepáticos; amigdalite de repetição; piodermite de repetição; infecção das vias aéreas superiores de repetição	itraconazol; sulfametoxanol + trimetoprima; ácido fólico
<b>P3</b>	M	15a1m	N	14a	14a3m	<i>Chromobacterium violaceum</i>	abscesso na coxa e região inguinal esquerda	itraconazol; sulfametoxanol + trimetoprima
<b>P4</b>	M	2a1m	N	5m	1a5m	-	abscesso em região cervical de repetição; pneumonia com derrame pleural; abscesso hepático; diarreia crônica; IVAS	itraconazol; sulfametoxanol + trimetoprima
<b>P5</b>	M	12a8m	N	9m	1a	Citomegalovirus, <i>Pseudomona aeruginosa</i>	múltiplos abscessos hepáticos; hepatoesplenomegalia; pneumonia	itraconazol; prednisona; isoniazida
<b>P6</b>	M	15a5m	N	6m	6a	-	amigdalite de repetição, infecção do trato urinário de	itraconazol; sulfametoxanol + trimetoprima; ácido fólico

							repetição, pneumonia de repetição, diarreia de repetição	
<b>P7</b>	M	5a1m	N	1m	5m	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	pneumonia de repetição, Infecções respiratórias agudas (IRA) viral	itraconazol; sulfametoxanol + trimetoprima; ácido fólico
<b>P8</b>	M	1a7m	N	2m	6m	BCGite	abcesso cutâneo, sepse, BCGite disseminada	itraconazol; sulfametoxanol + trimetoprima; ácido fólico
<b>P9</b>	F	19a3m	N	28d	10a	-	pneumonia, abscessos cutâneos e sublingual, abcesso amigdaliano, linfadenopatia, granuloma vocal	fluconazol; sulfametoxanol + trimetoprima; ácido fólico.
<b>P10</b>	F	20a1m	N	7a2m	8a	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Otite de repetição, pneumonia, amigdalite de repetição, linfadenopatia (hiperplasia do linfonodo), osteomielite, diarreia de repetição, abcesso na coxa	itraconazol; fluconazol; sulfametoxanol + trimetoprima
<b>P11</b>	F	21a11m	N	10a	16a	-	Pneumonia de repetição, abscessos em região cervical com drenagem de secreção purulenta, abscessos na perna	itraconazol; sulfametoxanol + trimetoprima

M= masculino; F= feminino; S= sim; N= não; a= anos; d= dias; m= meses.

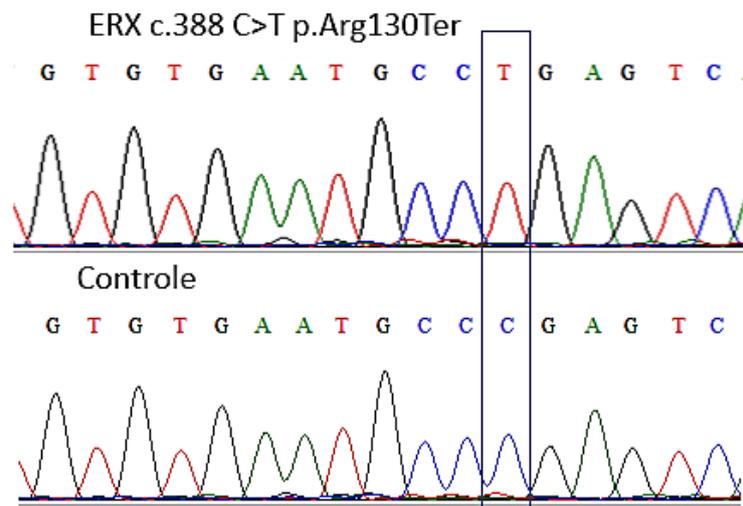
## 4.2 Variantes genéticas identificadas nos pacientes DGC

Em nossa coorte, obtivemos o total de cinco pacientes com diagnóstico molecular concluído. Dois pacientes (**P5** e **P6**) já apresentavam investigação genética prévia ao estudo, sendo identificadas as variantes patogênicas *nonsense* c.1140 G>A (p.Trp380X) no paciente **P5** e *missense* c.1027 A>C (p.Thr343Pro) no paciente **P6**. Ambas as variantes estão localizadas no gene *CYBB*, o gene mais comumente afetado na DGC. Assim, realizamos o sequenciamento completo do exoma dos 9 pacientes.

Em três pacientes identificamos variantes previstas como patogênicas pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) e associadas a DGC na literatura.

A análise do sequenciamento de exoma completo do **P4** resultou na identificação da variante *nonsense* c.388 C>T (p.Arg130X), identificada em hemizigose no exon 5 do gene *CYBB* (transcrito ENST00000378588), resultando na substituição do aminoácido arginina no resíduo 130 por um códon de parada prematuro, causando uma proteína truncada (**Figura 8**).

**Figura 8.** Cromatogramas de seqüências de DNAG do exon 5 do gene *CYBB*.

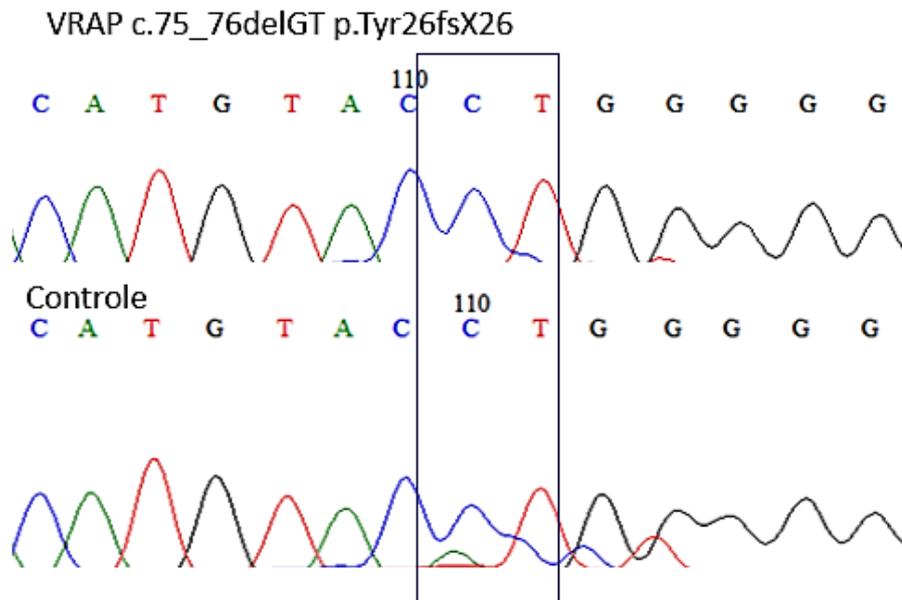


No cromatograma superior (P4) podemos observar a substituição de base C por T em comparação com cromatograma de um indivíduo controle.

No **P7** detectamos a variante *nonsense* c.868C>T (p.Arg290X), situada em hemizigose no exon 8 do gene *CYBB* (transcrito ENST00000378588), a qual resulta na substituição do aminoácido arginina no resíduo 290 por um códon de parada prematuro, também gerando uma proteína truncada.

Pelo método de Sanger, detectamos na **P10** a variante *c.75\_76delGT*, no início do exon 2 do gene *NCF1*, gerando a substituição do aminoácido tirosina no resíduo 26 por um códon de parada prematuro (**Figura 9**).

**Figura 9.** Cromatogramas de seqüências de DNAg do exon 2 do gene *NCF1*.



No cromatograma superior (P10) podemos observar a ausência das bases GT, representadas pela ausência dos picos AC presentes na fita reversa do gene *NCF1* em comparação com cromatograma de um indivíduo controle.

Vale destacar que não foram identificadas variantes em genes relacionados a outras falhas de fagócitos, como G6PD ou MSMD.

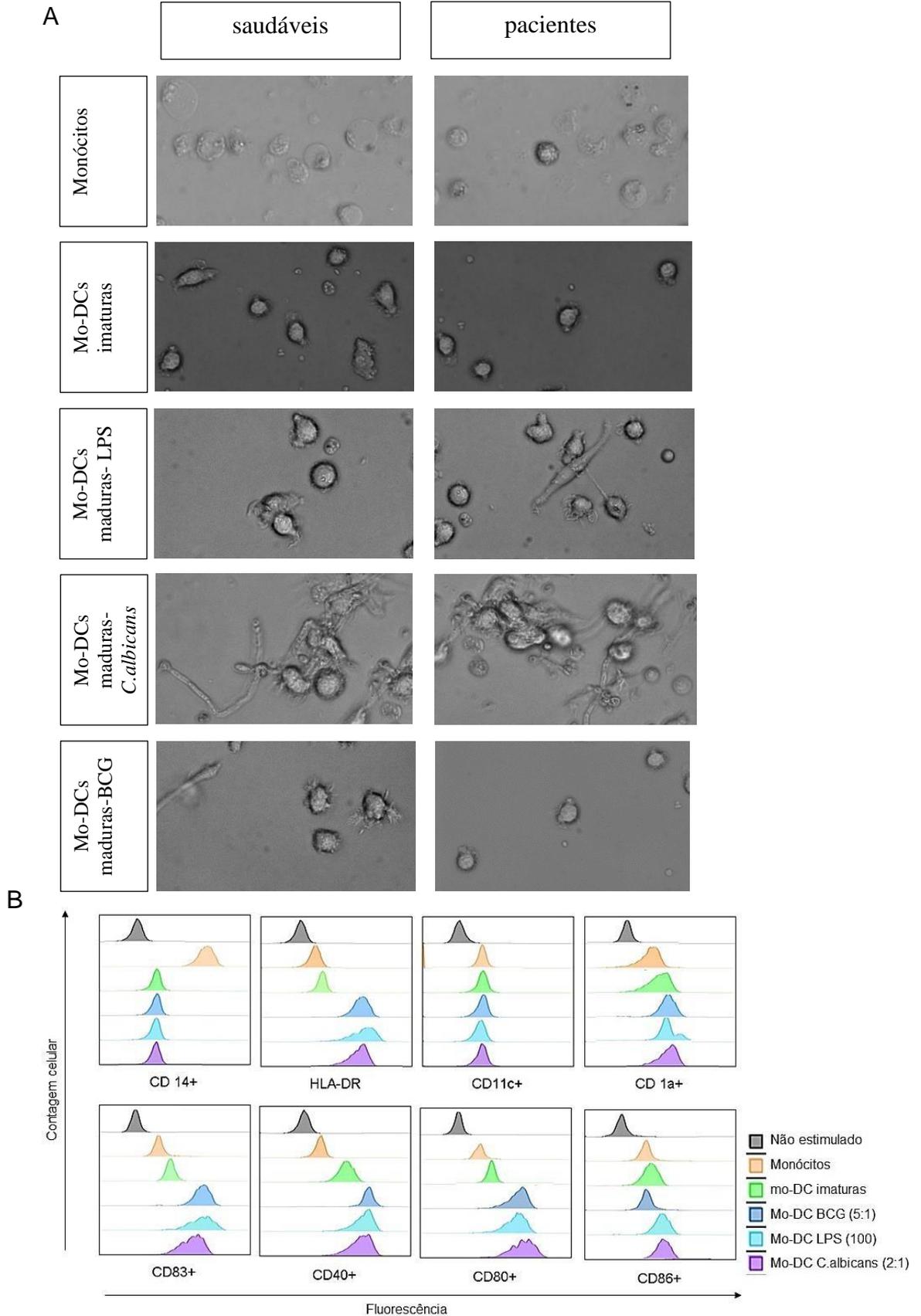
### 4.3 Avaliação das células dendríticas a partir monócitos (mo-DCs)

Devido ao papel fundamental das células dendríticas como APCs no desencadeamento de respostas imunes mediadas por células T, originamos células dendríticas a partir de monócitos isolados de PBMC por seleção magnética positiva usando *microbeads* magnéticas anti-CD14. Os monócitos foram cultivados com GM-CSF e IL-4 por 5 dias para obtenção de mo-DCs imaturas. As mo-DCs foram maturadas no quinto dia de cultura com: (a) BCG no MOI de 5:1; (b) LPS na concentração de 100 ng/mL; e (c) *Candida albicans* no MOI de 2:1 por 24 horas.

Conforme apresentado na **Figura 10A**, podemos destacar que os monócitos cultivados na presença de GM-CSF e IL-4 apresentam alterações no aspecto morfológico, onde as mo-DCs imaturas apresentaram aspecto mais arredondados, tornando-se maiores, mais espaiadas, com prolongamentos celulares e levemente fusiformes após diferenciação em mo-DC maduras. Não houve diferença morfológica entre as células dos indivíduos saudáveis e pacientes DGC.

O padrão da expressão dos marcadores CD-14, HLA-DR, CD11c, CD1a, CD83, CD80, CD86 e CD40 obtido nas populações de monócitos, mo-DC imaturas e mo-DCs maduras indicam que a diferenciação celular ocorreu conforme o esperado (**Figura 10B**). As células de indivíduos saudáveis e pacientes DGC utilizada nos ensaios apresentaram cerca de 70% de viabilidade celular (**Apêndice A**).

**Figura 10.** Morfologia e padrão da expressão de marcadores CD14, HLA-DR, CD11c, CD1a, CD83, CD40, CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas derivadas de monócitos.



Após cinco dias de cultura sob estímulo de GM-CSF e IL-4, as DCs imaturas foram geradas, mudando sua morfologia e expressão de moléculas após a ativação. (A) As células de indivíduos saudáveis e pacientes foram observadas em microscópio invertido. (B) Padrão representativo da expressão molecular de um indivíduo saudável analisado por citometria de fluxo. Histogramas representativos da expressão das moléculas CD14, HLA-DR, CD11c, CD1a, CD83, CD40, CD80 e CD86 nas populações de células. Linha laranja: monócitos, linha verde: mo-DCs imaturas; Linha azul escuro: mo-DCs ativadas com BCG (5:1 MOI); Linha azul claro: mo-DCs ativadas com LPS (100ng/ml); Linha roxa: mo-DCs ativadas com *C.albicans* (2:1 MOI).

#### 4.4 As mo-DCs de pacientes DGC apresentam alterações fenotípicas

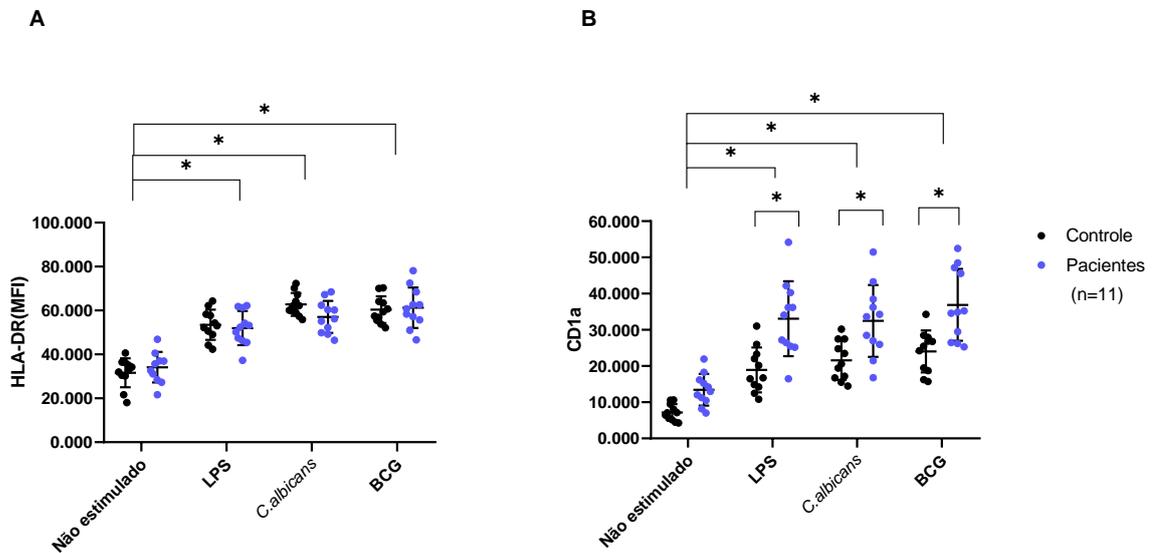
##### 4.4.1 Avaliação de HLA-DR e CD1a em mo-DCs de pacientes DGC

Avaliamos a apresentação de antígeno via MHC-II pela expressão de HLA-DR e apresentação de antígeno não proteico pela expressão de CD1a em pacientes DGC em relação a indivíduos saudáveis (**Figura 11**).

As mo-DCs de pacientes DGC revelaram-se capazes de expressar a molécula HLA-DR em quantidades semelhantes a indivíduos saudáveis. Em ambos os grupos houve aumento do MFI da molécula após a ativação das mo-DCs com LPS, *Candida albicans* e BCG. As mo-DCs ativadas de pacientes DGC não apresentaram diferença significativa de MFI em comparação com o as mo-DCs ativadas de indivíduos saudáveis (**Figura 11A**).

Avaliamos ainda outra molécula apresentadora de antígeno, o CD1a, que por vez apresenta antígenos lipoprotéicos a linfócitos T. O CD1a encontrou-se expresso nas mo-DCs imaturas, sem apresentar diferença entre células dos pacientes DGC e indivíduos saudáveis. Surpreendentemente, após os estímulos, houve um aumento de CD1a nos pacientes DGC em comparação com os indivíduos saudáveis ( $p < 0,05$ ). Nos pacientes DGC, o MFI se apresentou 2,4; 2,4 e 2,7 vezes maior após ativação com LPS, *Candida albicans* e BCG em comparação com as mo-DCs de indivíduos saudáveis (**Figura 10B**).

**Figura 11.** Expressão das moléculas HLA-DR e CD1a na superfície de mo-DCs de indivíduos saudáveis e pacientes DGC.



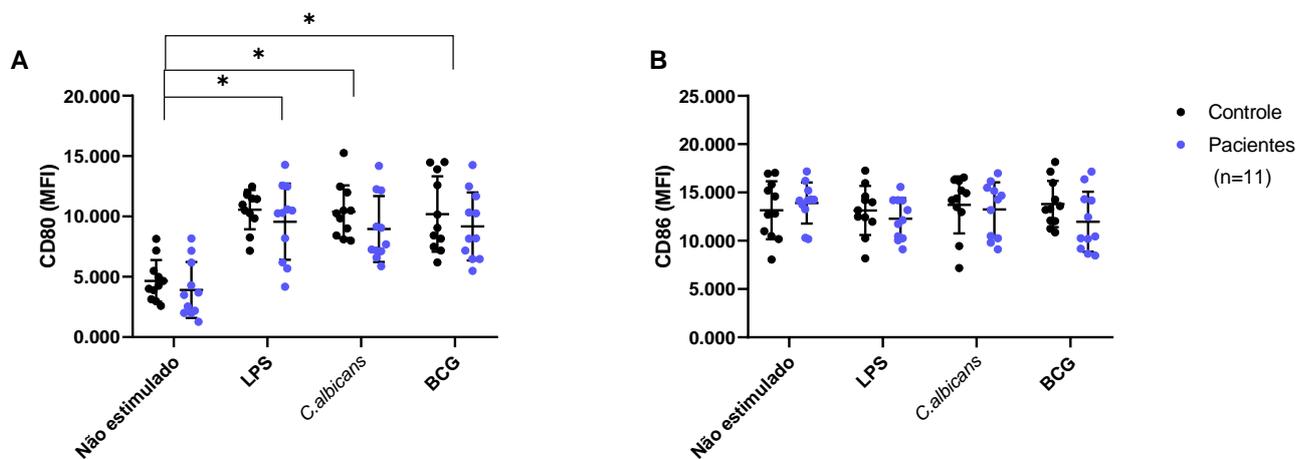
(A) Observamos que não houve alteração da expressão de HLA-DR em mo-DCs de pacientes em relação a indivíduos saudáveis. (B) Aumento da expressão da molécula CD1a em mo-DCs maduras de pacientes DGC pulsadas com LPS, *C.albicans* e BCG. As expressões das moléculas foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo, sendo utilizado a análise Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's (n=11),  $p < 0,05$ . Não estimulado: mo-DCs imaturas; LPS: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com 100ng/mL de LPS; *C.albicans*: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com MOI 2:1 de *Candida albicans*; BCG: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com MOI 5:1 de BCG.

#### 4.4.2 Avaliação de CD80, CD86, CD83 e CD40 em pacientes DGC

Avaliamos a expressão dos marcadores CD80, CD86, CD83 e CD40 em pacientes DGC, que compreendem importantes moléculas coestimuladoras das mo-DCs. As mo-DCs imaturas de pacientes DGC e indivíduos saudáveis não apresentaram diferenças na expressão dos marcadores CD80, CD86, CD83 e CD40. Todas essas moléculas revelaram-se pouco expressas nas mo-DCs imaturas tanto de pacientes DGC, quanto de indivíduos saudáveis.

Avaliando a expressão do CD80, notamos que houve um aumento significativo do MFI após a ativação das mo-DCs com LPS, *Candida albicans* e BCG. Esse aumento foi semelhante em mo-DCs de pacientes DGC e indivíduos saudáveis. (**Figura 12A**). O marcador CD86 não apresentou variações na expressão do MFI após ativação com LPS, *Candida albicans* e BCG (**Figura 12B**).

**Figura 12.** Expressão das moléculas CD80 e CD86 na superfície de mo-DCs de indivíduos saudáveis e pacientes DGC.

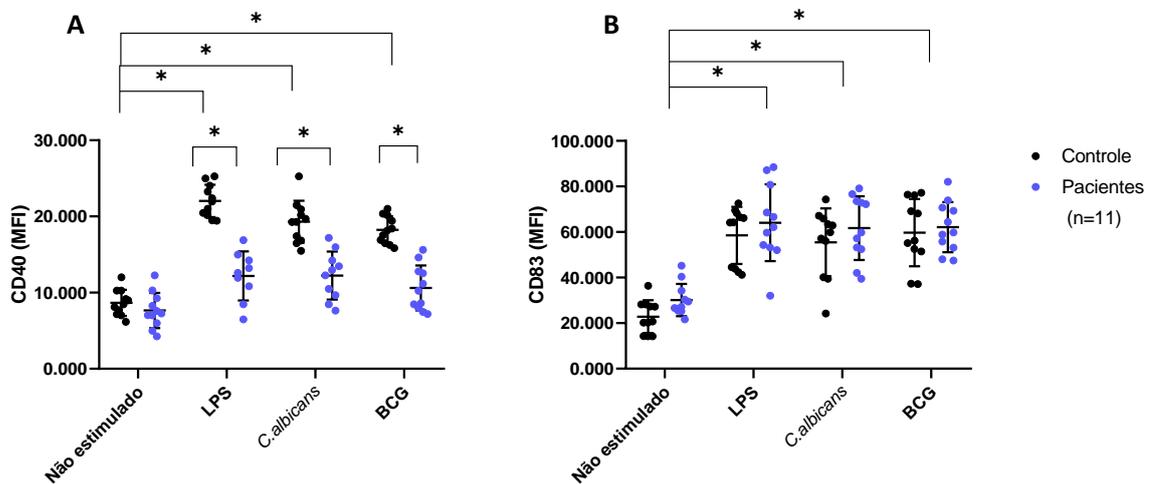


Observamos que não houve alteração da expressão de (A)CD80 e (B) CD86 em mo-DCs de pacientes em relação a indivíduos saudáveis. As expressões das moléculas foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo, sendo utilizado a análise Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's (n=11). BCG: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com MOI 5:1 de BCG; LPS: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com 100ng/mL de LPS; *C. albicans*: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com MOI 2:1 de *Candida albicans*.

Previamente a estimulação, o CD40 não apresentou diferença de expressão em mo-DCs de pacientes DGC e indivíduos saudáveis. Porém, após a estimulação, o DC40 apresentou uma menor expressão nos pacientes DGC ( $p < 0,05$ ) (**Figura 13A**).

O marcador de ativação de células dendríticas CD83, aumentou sua expressão após a ativação com LPS, *Candida albicans* e BCG de forma semelhante nos pacientes DGC e indivíduos saudáveis. Assim, não houve diferença significativa da expressão de CD83 entre mo-DCs ativadas de pacientes DGC e indivíduos saudáveis (**Figura 13B**).

**Figura 13.** Expressão das moléculas CD40 e CD83 na superfície de mo-DCs de indivíduos saudáveis e pacientes DGC.



(A) Observamos que não houve alteração da expressão de HLA-DR em mo-DCs de pacientes em relação a indivíduos saudáveis. (B) Aumento da expressão da molécula CD1a em mo-DCs de pacientes DGC pulsadas com LPS, *C. albicans* e BCG. Dados obtidos. As expressões das moléculas foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo, sendo utilizado a análise Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's ( $n=11$ ). BCG: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com MOI 5:1 de BCG; LPS: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com 100ng/mL de LPS; *C. albicans*: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com MOI 2:1 de *Candida albicans*.

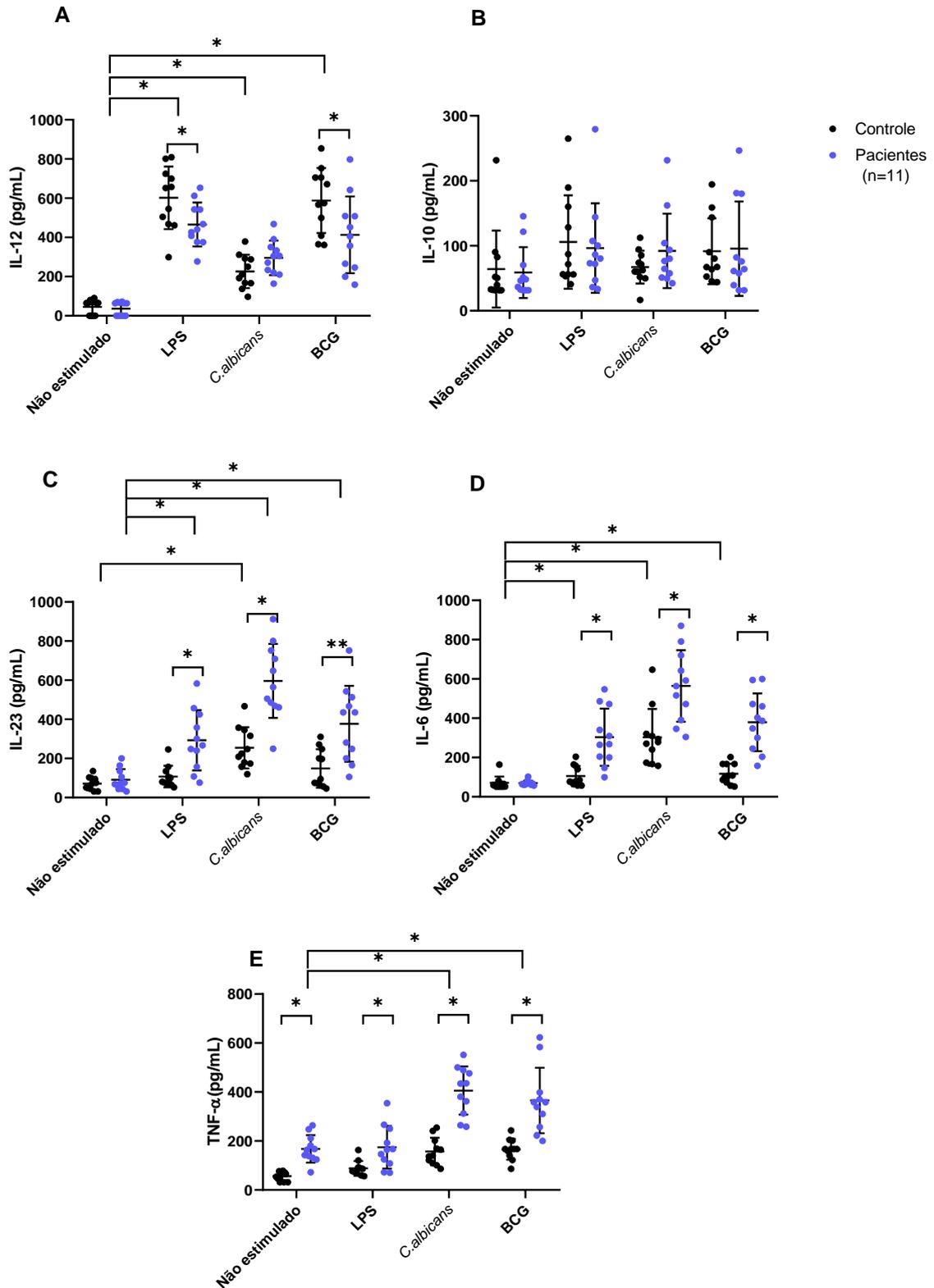
#### 4.4.3 Avaliação da produção de citocinas por mo-DCs de pacientes DGC

A produção de citocinas consiste em um aspecto funcional importante da maturação e diferenciação das mo-DCs e tem um impacto crítico na capacidade das mo-DCs de ativar e diferenciar linfócitos T (**Figura 14**). Portanto, analisamos o perfil de expressão de TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-23, IL-6 e IL-10 produzidas por mo-DCs imaturas e maduras pelo ensaio de ELISA a partir de sobrenadantes congelados em alíquotas obtidas no 5º e 6º dia de cultura.

Resultados obtidos a partir da dosagem de citocinas das mo-DCs imaturas de pacientes DGC revelaram a expressão basal de IL-12p70, IL-6, IL-23 e IL-10, análogas a indivíduos saudáveis. Apenas a expressão de TNF- $\alpha$  em mo-DCs imaturas de pacientes DGC apresentou-se elevada em relação a indivíduos saudáveis ( $p < 0,05$ ).

Interessantemente, após a ativação das mo-DCs, os pacientes DGC apresentaram respostas diferentes dos indivíduos saudáveis, havendo uma expressão das citocinas altamente variável. As mo-DCs de pacientes DGC ativadas com LPS, BCG e *Candida albicans* apresentaram um aumento significativa da expressão de IL-6, IL-23 e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). Ainda, nos grupos estimulados com LPS e BCG foi possível observar a diminuição da expressão de IL-12p70 em relação a indivíduos saudáveis ( $p < 0,05$ ).

**Figura 14.** Quantificação da produção de IL-12 (A), IL-10 (B), IL-23 (C), IL-6 (D) e TNF- $\alpha$  (E) presentes no sobrenadante de culturas de mo-DCs avaliados pelo ensaio de ELISA.



Os gráficos apresentam a mediana da produção de citocinas em pg/mL. Não estimulado: mo-DCs não estimuladas do sexto dia de cultura; e mo-DCs estimuladas com BCG (MOI 5:1), *C.albicans* (MOI 2:1) e LPS (100ng/mL). Diferenças estatísticas estão demonstradas pelo (\*) P<0,05; n=11; Kruskal-Wallis, pós teste Dun's).

#### 4.4.4 Linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes DGC apresentam desequilíbrio da resposta

##### Th1/Th17

Linfócitos T *naïve* autólogos foram adicionados a cultura de mo-DCs estimuladas com BCG (5:1 MOI), LPS (100 ng/mL) e *Candida albicans* (2:1 MOI) na proporção de 5:1, sendo acondicionado em estufa a 37°C por 5 dias. Foi avaliada a expressão de moléculas de superfície CD3, CD4, CD8, CD 45RA e CCR7 por citometria de fluxo a fim de avaliar se houve a diferenciação linfocitária e moléculas intracelulares para avaliar a polarização em Th1(T-bet e STAT-4) e Th17 (ROR $\gamma$ T e STAT-3).

Os linfócitos foram avaliados de acordo com o estágio de diferenciação em células *Tnaïve* (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) e efetoras (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) (**Figura 15**). A quantidade de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> foi de 5,02 $\pm$ 2,85% em coculturas com mo-DCs imaturas de pacientes DGC e 5,39 $\pm$ 1,96% em indivíduos saudáveis, não apresentando diferença significativa.

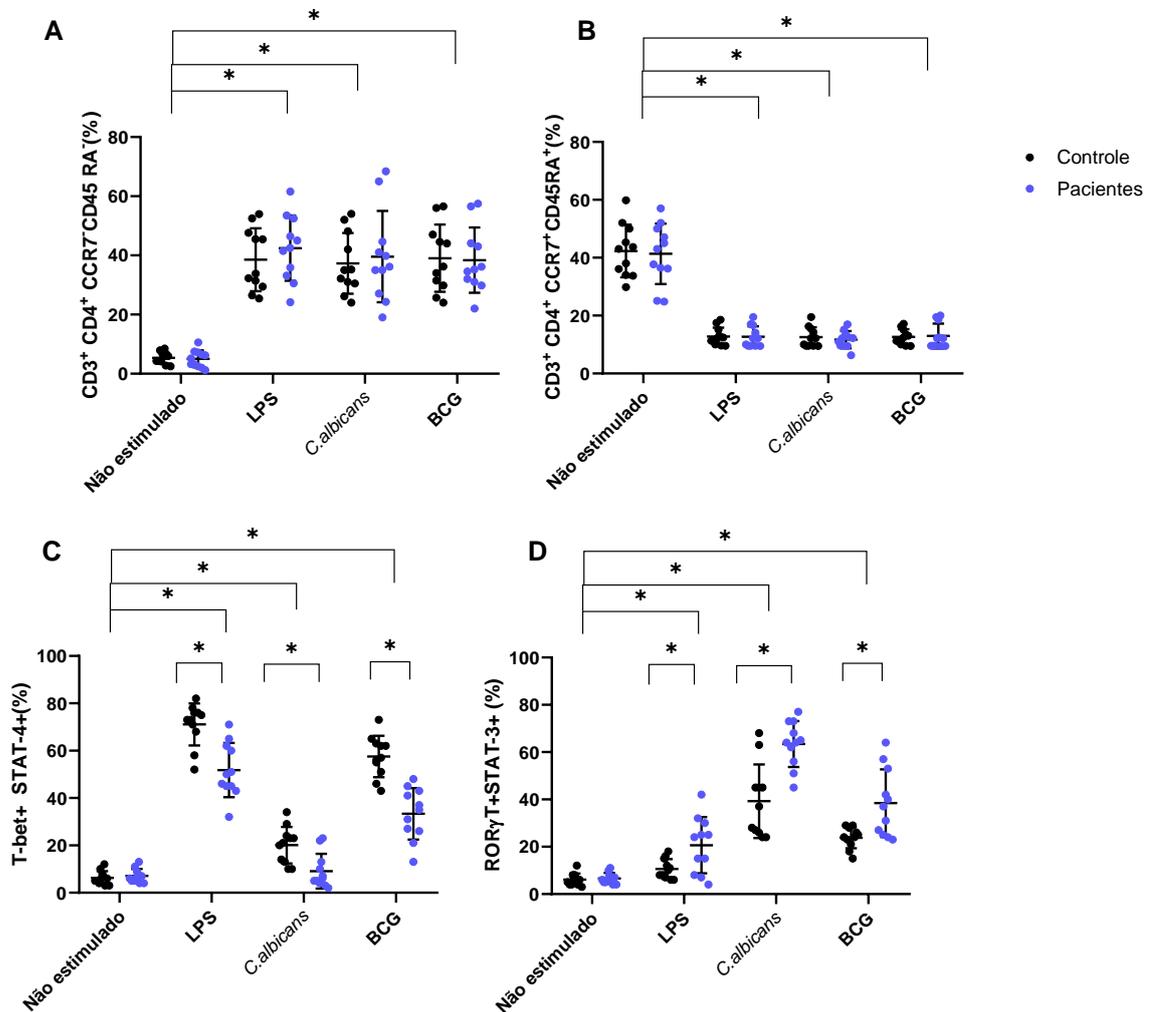
Em pacientes DGC, as coculturas de linfócitos cocultivados com mo-DCs estimuladas com BCG, LPS e *C.albicans*, apresentaram um aumento do número de células efetoras, havendo respectivamente o total de 22,44 $\pm$ 6,40%; 25,05 $\pm$ 8,96% e 22,93 $\pm$ 8,67% de linfócitos efetores. Os pacientes DGC apresentaram valores coerentes com os indivíduos saudáveis, os quais apresentaram 22,17 $\pm$ 6,37; 23,57 $\pm$ 7,52 e 25,42 $\pm$ 6,99 (**Figura 15A**).

Para a avaliação da polarização dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram utilizados os marcadores T-bet e STAT-4 para resposta Th1 e ROR $\gamma$ T e STAT-3 para resposta Th17. Nos pacientes, os linfócitos T cocultivados com mo-DCs estimuladas com LPS, BCG e *C.albicans* apresentaram um desbalanço na proporção de células Th1 e Th17 em relação a indivíduos controle.

Quanto aos linfócitos Th1 efetores nos grupos estimulados com LPS, *C.albicans* e BCG, os pacientes DGC apresentaram respectivamente populações de 51,21 $\pm$ 11,46%; 9,09 $\pm$ 7,27% e 33,36 $\pm$ 10,88%, valores significativamente inferiores ao 65,42 $\pm$ 6,24%; 21,85 $\pm$ 4,58% e 57,14 $\pm$ 7,32% presentes nos indivíduos controle (**figura 15C**).

Por outro lado, pacientes com DGC apresentaram um aumento significativo da população de células Th17 estimuladas com LPS, *C.albicans* e BCG, apresentaram respectivamente 20,64 $\pm$ 6,87, 63,45 $\pm$ 6,70% e 38,45 $\pm$ 8,47%, valores significativamente superior aos 10,64 $\pm$ 4,18%, 39,27 $\pm$ 7,53% e 23,82 $\pm$ 4,44%, presentes nos indivíduos controle (**Figura 15D**).

**Figura 15.** Avaliação de populações de linfócitos Th1 e Th17 efetores em Pacientes DGC e indivíduos controle.



Porcentagem da população de células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CCR<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup> e CD3<sup>+</sup> (A) e CD4<sup>+</sup>, CCR<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup> (B) em cocultura de linfócitos com mo-DCs estimuladas com BCG (5:1 MOI), LPS (100 ng/mL) e *Candida albicans* (2:1 MOI). Porcentagem de células T-bet<sup>+</sup>STAT-4<sup>+</sup> (B) e RORγT<sup>+</sup>STAT-3<sup>+</sup>(C) expressa na subpopulação CD4<sup>+</sup>, CCR<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup> de linfócitos T cocultivados com mo-DCs estimuladas com BCG (5:1 MOI), LPS (100 ng/mL) e *Candida albicans* (2:1 MOI). A expressão das moléculas foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo, sendo utilizado a análise Kruskal Wallis(p<0,05) seguido pelo pós teste Dunns (n=11).

#### **4.4.5 Avaliação da expressão de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-6 em cocultura de mo-DCs com linfócitos T de pacientes DGC**

A produção de citocinas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> consiste em uma etapa crucial no direcionamento das respostas imunes, podendo desencadear e amplificar o processo inflamatório. Assim, analisamos a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-6 em linfócitos T cocultivados com mo-DCs estimuladas com LPS (100 ng/mL), *Candida albicans* (2:1 MOI) e BCG (5:1 MOI) pelo ensaio de ELISA a partir de sobrenadantes congelados em alíquotas obtidas no 5º dia de cultura.

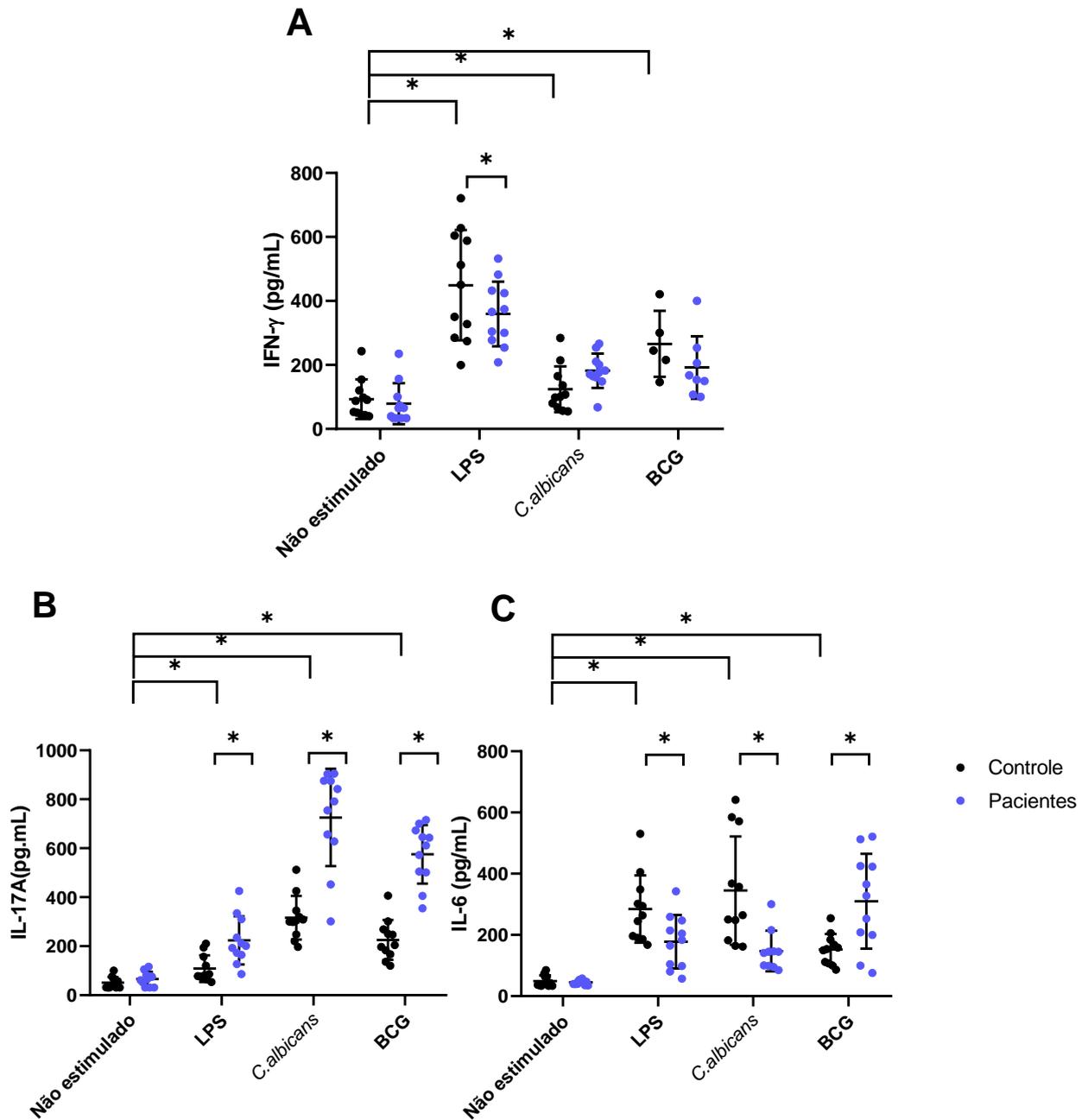
As mo-DCs imaturas de pacientes DGC apresentaram expressão basal de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-6, não apresentando diferença significativa em relação as mo-DCs imaturas de indivíduos saudáveis.

Nos pacientes DGC, as coculturas de linfócitos com mo-DCs ativadas com LPS apresentaram uma expressão reduzida de IFN- $\gamma$  e IL-6 em comparação a indivíduos saudáveis. Em contrapartida houve o aumento significativo de IL-17.

A resposta linfocitária em pacientes DGC desencadeada por mo-DCs ativadas com *Candida albicans* apresentou um aumento da expressão de IL-17A e diminuição de IL-6 em relação a indivíduos saudáveis.

Por fim, coculturas de linfócitos de pacientes DGC com mo-DCs autólogas ativadas com BCG apresentaram elevação de IL-17A e IL-6 em relação a indivíduos saudáveis.

**Figura 16.** Quantificação da produção de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-6 presentes no sobrenadante de coculturas de linfócitos T *naïve* cocultivados com mo-DCs estimuladas com BCG (5:1 MOI), LPS (100 ng/mL) e *Candida albicans* (2:1 MOI) por ELISA.



Os gráficos apresentam a mediana da produção de citocinas em pg/mL. CN: Controle Negativo; BCG: T *naïve* cocultivados com mo-DCs estimuladas com BCG (5:1 MOI) por 4 dias; LPS: T *naïve* cocultivados com mo-DCs estimuladas com LPS (100 ng/mL) por 4 dias; *C. albicans*: T *naïve* cocultivados com mo-DCs estimuladas com *Candida albicans* (2:1 MOI) por 4 dias. Teste Kruskal-Wallis seguido pós teste Dunn's para múltipla comparação.

## **6 DISCUSSÃO**

---

A doença granulomatosa crônica (DGC) compreende uma imunodeficiência primária rara causada por mutações de perda de função em genes que codificam a NADPH oxidase, culminando na falha da explosão respiratória em fagócitos. Desse modo, atividades microbidas e regulatórias de mediadores inflamatórios exercidos pelas espécies reativas de oxigênio encontram-se comprometidas nos pacientes com DGC, gerando um quadro de susceptibilidade a infecções e hiperinflamação (Zerbe, Marciano e Holland, 2020).

Neste estudo, foram descritas manifestações clínicas detalhadas, análise genética e ensaios funcionais de 11 pacientes com DGC do território nacional. Na presente coorte, a maioria dos indivíduos (72,73%; n=8) apresentaram a primeira manifestação clínica precoce (entre 28 dias e 2 anos). Dentre os demais casos, dois apresentaram a primeira manifestação ainda na infância (7 e 10 anos) e um na adolescência (14 anos). Na maioria dos casos (n=7) ocorreu atraso significativo no diagnóstico, ocorrendo entre 12 meses e 16 anos após a primeira manifestação clínica. Este fator pode ser atribuído a falta de medidas públicas nacionais sobre imunodeficiências primárias e triagem para DGC.

Corroborando com estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa em uma coorte de 71 pacientes DGC da América Latina (de Oliveira-Junior et al., 2015), abscessos e pneumonia foram manifestações comumente relatadas em pacientes DGC. Estas manifestações clínicas também foram descritas por Carnide e colaboradores (2005) em uma coorte de dezoito pacientes brasileiros portadores de DGC, além de linfadenopatia e hepatoesplenomegalia.

Os microrganismos patogênicos isolados nos pacientes da presente coorte são consistentes com estudos realizados na Europa e América do Norte, os quais indicam infecções por *S.aureus*, *Aspergillus* spp. e *Pseudomonas* spp. como as mais recorrentes (Winkelstein et al., 2000; Segal et al., 2011 e Marciano et al., 2015). De Oliveira-Junior et al., 2015 destaca que independentemente da geografia, os estudos de DGC revelam doenças infecciosas variadas, porém semelhantes.

Em nossa coorte foi reportado um caso com BCGite. Em pacientes com DGC, a vacinação é contraindicada, porém decorrente da administração ao nascimento em países onde a tuberculose é endêmica, alguns pacientes podem desenvolver complicações, apresentado desde abscessos, úlceras, fístulas e adenite no local da vacinação, a disseminação do bacilo atenuado no fígado, pulmão e cérebro (Deffert et al., 2014).

Todos os pacientes da coorte apresentam falha na explosão respiratória quantificadas pelo ensaio DHR, considerado padrão ouro no diagnóstico da DGC (Vowells et al.,1995). Todavia, tendo em vista um diagnóstico preciso da DGC, realizamos a análise genética dos pacientes. Dois pacientes da coorte já haviam realizado investigação genética previamente ao nosso estudo. Assim, amostras de 9 pacientes desprovidos de investigação genética nos foram encaminhadas, das quais identificamos as variantes patogênicas c.388 C>T (p.Arg130X) c.868C>T (p.Arg290Ter), c.75\_76delGT (p.Tyr26fsX26) nos pacientes **P4**, **P7** e **P10**, respectivamente. A investigação molecular permitiu o devido aconselhamento genético dos pacientes, buscando o aumento da qualidade de vida dos indivíduos. Nossos achados auxiliaram o **P4** a ser encaminhado para o transplante de medula óssea.

Nos demais seis pacientes não foram identificadas variantes patogênicas associadas a DGC, nem variantes preditivas de DGC de acordo com a Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG). Embora ideal para o aconselhamento genético, o diagnóstico genético na DGC ainda é um desafio. A técnica de sequenciamento por EXOMA apresenta algumas limitações que podem não permitir que o sequenciamento ocorra com alta cobertura, como em casos de mutação por deleção de todo o gene, deleção de sequências gênicas de tamanho superior a 10 pares de base, mutações não situadas em exons e mutações em pseudogenes.

Uma vez bem caracterizada a nossa coorte, realizamos ensaios funcionais, com amostra de sangue periférico dos 11 pacientes, a fim de investigar os mecanismos de apresentação de antígeno e polarização de linfócitos Th1 e Th17 como alvos do processo de inflamação descrita em pacientes DGC. Avaliamos a resposta destas células frente aos desafios LPS, *Candida albicans* e BCG.

Células dendríticas podem ser encontradas em dois estágios funcionais: imaturas e maduras. Estes estágios podem ser distinguidos pela prioridade em fagocitar e processar antígenos desempenhado pelas DCs imaturas, enquanto DCs maduras adquirem função de ativar células T virgens específicas de antígeno em órgãos linfoides secundários (Worbs, Hammerschmidt e Förster, 2017). Por um lado, durante a maturação, as DCs reduzem a expressão de moléculas de adesão, reorganizam seu citoesqueleto, aumentam sua motilidade, reduzem a atividade endocítica (Winzler et al., 1997; Reis e Sousa, 2006). Por outra perspectiva, há o aumento da expressão de MHC-II e moléculas coestimuladoras (Steinman, 2012). Nossos dados revelaram que em relação aos monócitos, as mo-DCs imaturas de pacientes DGC

apresentam uma redução semelhante a indivíduos saudáveis do marcador CD14, bem como aumento da produção de HLA-DR, CD1a, CD83, CD80, CD86 e CD40. Ao serem pulsadas com o LPS, *Candida albicans* e BCG, houve o aumento da expressão de HLA-DR, CD83 e CD80. Em nossos resultados, CD86 não apresentou alteração de expressão em monócitos, mo-DCs imaturas e maduras, o que pode ser justificado devido CD86 se tratar de uma molécula coestimuladora constitutiva (Lozanoska-Ochser et al., 2008).

Notavelmente, mo-DCs maduras de pacientes com DGC apresentaram elevada expressão de CD1a. Estudos em modelo de camundongo e pacientes com psoríase apontam que o CD1a atua amplificando respostas inflamatórias mediadas por células Th17 reativas com antígenos lipídicos próprios. O tratamento com anticorpos bloqueadores contra CD1a aliviou a inflamação da pele (Kim et al., 2016).

O CD40 expresso na superfície de mo-DCs maduras de pacientes DGC apresentou baixa expressão em relação a indivíduos saudáveis. Uma baixa expressão de CD40 em paciente DGC também é evidente em neutrófilos estimulados *in vitro* com PMA e ionomicina. (SALMEN et al., 2007). Estudos prévios relatam que o CD40 induz a produção de IL-12 em células dendríticas, direcionando uma resposta celular Th1 (O'sullivan e Thomas, 2003; Quezada et al., 2004; Elgueta et al., 2009). Todavia, o papel do CD40 na resposta Th17 ainda não foi estabelecido. Perona-Wright e colaboradores (2009) sugerem que o CD40 possui um papel na indução da expressão de IL-6 e consequente produção de IL-17.

Os diferentes estímulos foram capazes de induzir diferentes padrões de citocinas. Os estímulos com LPS e BCG culminaram no aumento anormal da expressão de citocinas inflamatórias IL-12p70, IL-6, IL-23 e TNF- $\alpha$  em pacientes DGC, ao passo que a *Candida albicans* induziu aumento exacerbado na produção de IL-23, IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Embora o mecanismo não seja claro, estudos sugerem que PI3K, um agente regulador das proteínas p47phox e p40phox, pode mediar a regulação positiva de IL-12 via p38-MAPK, em DC e macrófagos (Zhang et al., 2000; Fukao, 2003; Ohtani et al., 2008).

Em humanos, o TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que promove a maturação e a sobrevivência da DC (Sallusto et al., 1994; Ludewig et al., 1995). O TNF- $\alpha$  é sintetizado como uma proteína transmembranar, a qual pode ser processada por metaloproteases resultando na liberação do ligante solúvel (Wajant et al., 2003). Estudos em modelos murinos revelaram que o TNF- $\alpha$  em forma solúvel é necessário para o desenvolvimento de inflamação aguda e crônica,

enquanto o TNF- $\alpha$  membranar pode proteger contra inflamação crônica e autoimunidade (Apostolaki et al., 2010).

A IL-23 é uma importante citocina capaz de regular tanto respostas Th1 estimulando o IFN (IFN)- $\gamma$ , quanto é capaz de desempenhar papel na manutenção da subpopulação de células Th17 (Hunter, et al., 2005). De forma complementar, a IL-6 é fundamental para a polarização da linhagem Th17 por meio da ativação de STAT-3 e indução de IL-17, que antagoniza os linfócitos Treg induzidos por IL-2/STAT5/ Foxp3 (Weaver et al., 2006; Laurence et al., 2007 e Yang et al., 2011).

Assim, a falha na explosão respiratória das células do sistema imune inato de pacientes DGC em eliminarem efetivamente a carga de patógenos resulta na constante estimulação de APCs, o que resulta na elevada produção de IL-23, IL-6 e culmina na expansão de linfócitos Th17 observada em nossos resultados de coculturas de linfócitos T com mo-DCs.

Nossos resultados demonstram que a falha da explosão respiratória em células dendríticas de pacientes DGC, acarreta alterações em receptores de apresentação de antígeno via não clássica e moléculas de expressão de mo-DCs maduras, bem como alteração da expressão de citocinas que podem contribuir para o desequilíbrio da ativação de linfócitos Th1/Th17 encontrados a partir da cocultura das mo-DCs maduras com linfócitos T CD4+ *naive*.

O desbalanço da resposta Th1/Th17 em pacientes DGC foi previamente relatado por Horváth e colaboradores (2011), sendo descrito a expansão de linfócitos Th17 associado ao aumento de IL-23, IL-17 e IL-21, e a diminuição de células Th1 associada a baixos níveis de IFN- $\gamma$  relatados em culturas de PBMC estimuladas com PMA+ionomicina.

Nossos achados mostram que embora os pacientes com DGC apresentem uma capacidade normal de diferenciação de células T *naïve* em células T efetoras, o comportamento de polarização para subpopulações de linfócitos é predominante Th17.

A hiperexpressão do eixo Th17 descrita em pacientes DGC culmina no aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-17A e IL-6, IL-8 (Geiszt et al., 1997; Deng et al., 2012) e IL-1 $\beta$  (Van De Veerdonk et al., 2010; Meissner et al., 2010), as quais atuam recrutando neutrófilos disfuncionais que apresentam apoptose tardia (Sanford et al., 2006). Além da apoptose, a eferocitose de neutrófilos apoptóticos é prejudicada por macrófagos de modelo murino de DGC, contribuindo para a hiperinflamação em camundongos (Fernandez-Boyanapalli et al., 2009;

Fernandez-Boyanapalli et al., 2010a; Fernandez-Boyanapalli et al., 2010b). Esse aumento de neutrófilos também pode acarretar formação de granulomas.

O aumento da expressão de IL-23, aumento da população de linfócitos Th17 e a produção exacerbada de IL-17A e IL-6 revelam que em pacientes DGC há uma ativação do eixo Th17, que tem sido relatado em uma gama de doenças inflamatórias, como doença inflamatória intestinal (Fujino et al., 2003), psoríase (Wilson et al., 2007), artrite reumatoide (Lee e Yap, 1994) e esclerose múltipla (Lock et al., 2002).

A correção da resposta Th1/Th17 foi relatada em dois pacientes DGC transplantados com células tronco hematopoiéticas, sendo observado aumento de células Th1 e diminuição de células Th17, normalizando a taxa Th1/Th17 quando compara a um indivíduo saudável (Horváth et al., 2011; Rieber et al., 2012).

Em suma, nossos dados demonstram que defeitos na maturação de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) de pacientes com DGC contribuem para o desequilíbrio na diferenciação de linfócitos T naive para os perfis Th1 e Th17. Esses dados expandem o entendimento acerca dos mecanismos de susceptibilidade e hiperinflamação presentes na DGC.

Do aspecto clínico e translacional, acreditamos que os presentes dados contribuirão para o delineamento de novos ensaios, que visam guiar a investigação de novas terapias que modulem a resposta Th1/Th17 em pacientes DGC. Embora a DGC se trate de uma falha de fagócitos, este estudo ressalta a necessidade de avaliações de mecanismos de respostas celulares como moduladoras do perfil inflamatório em pacientes DGC.

## **7 CONCLUSÃO**

---

Os dados obtidos no presente estudo *in vitro* a partir de amostras provenientes de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica nos permite concluir que:

- a) Conforme observado na nossa coorte, a DGC pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas, abrangendo desde susceptibilidade a infecções fúngicas e bacterianas a hiperinflamação.
- b) Participaram do presente estudo 11 pacientes, todos com ensaio funcional de DHR alterado e clínica sugestiva de DGC. Devido a limitações nas técnicas de estudo genéticos empregados neste estudo, conseguimos identificar variantes genéticas em apenas 5 pacientes, sendo 4 no gene *CYBB* e uma no gene *NCF1*.
- c) As mo-DCs maduras de pacientes DGC apresentaram uma elevada expressão de CD1a e diminuição significativa de CD40, que são importantes moléculas de superfície na indução de sinais para polarização de linfócitos Th1 e Th17.
- d) Mo-DCs maduras de pacientes DGC apresentam elevada produção de citocinas indutoras de respostas Th17 (IL-23 e IL-6) e respostas Th1 (IL-12p70).
- e) Linfócitos T CD4+ de pacientes DGC apresentam um desbalanço população de células Th1 e Th17, havendo uma hiperativação do eixo Th17, observado na expansão de células Th17 e citocinas IL-17 e IL-6.

## **REFERÊNCIAS**

---

ABEBE, Fekadu. Synergy between Th1 and Th2 responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection: A review of current understanding: The paper discusses the importance of simultaneous induction of Th1/Th2 responses to design and develop vaccine against TB. **International Reviews of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 172-179, 2019.

ALLAN, Euan RO et al. NADPH oxidase modifies patterns of MHC class II-restricted epitopic repertoires through redox control of antigen processing. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 11, p. 4989-5001, 2014.

ÁLVAREZ-CARDONA, Aristóteles et al. Intravenous immunoglobulin treatment for macrophage activation syndrome complicating chronic granulomatous disease. **Journal of clinical immunology**, v. 32, n. 2, p. 207-211, 2012.

AMENT, Marvin E.; OCHS, Hans D. Gastrointestinal manifestations of chronic granulomatous disease. **New England Journal of Medicine**, v. 288, n. 8, p. 382-387, 1973.

ANDERSON-COHEN, Mindy et al. Severe phenotype of chronic granulomatous disease presenting in a female with a de novo mutation in gp91-phox and a non familial, extremely skewed X chromosome inactivation. **Clinical Immunology**, v. 109, n. 3, p. 308-317, 2003.

ANGELINO, Giulia et al. Inflammatory bowel disease in chronic granulomatous disease: an emerging problem over a twenty years' experience. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 28, n. 8, p. 801-809, 2017.

APOSTOLAKI, Maria et al. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. **TNF Pathophysiology**, v. 11, p. 1-26, 2010.

ARNADOTTIR, Gudny A. et al. A homozygous loss-of-function mutation leading to CYBC1 deficiency causes chronic granulomatous disease. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2018.

BLANCAS-GALICIA, Lizbeth et al. Genetic, immunological, and clinical features of the first Mexican cohort of patients with chronic granulomatous disease. **Journal of clinical immunology**, v. 40, n. 3, p. 475-493, 2020.

BRIDGES, ROBERT A.; BERENDES, HEINZ; GOOD, ROBERT A. A fatal granulomatous disease of childhood: the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. **AMA journal of diseases of children**, v. 97, n. 4, p. 387-408, 1959.

BYLUND, Johan et al. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 12, p. 1834-1845, 2010.

CABEZA-CABRERIZO, Mar et al. Dendritic cells revisited. **Annual review of immunology**, v. 39, p. 131-166, 2021.

- CACHAT, Julien et al. Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity. **Clinical science**, v. 128, n. 10, p. 635-648, 2015.
- CAO, Xuetao. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 35-50, 2016.
- CARENZA, Claudia et al. Costimulatory molecules and immune checkpoints are differentially expressed on different subsets of dendritic cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1325, 2019.
- CARNIDE, Eugénia Grilo et al. Clinical and laboratory aspects of chronic granulomatous disease in description of eighteen patients. **Pediatric allergy and immunology**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2005.
- CHEN, Linlin et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204, 2018.
- CONTI, Francesca et al. Mycobacterial disease in patients with chronic granulomatous disease: a retrospective analysis of 71 cases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 1, p. 241-248. e3, 2016.
- DE JONG, Esther C.; SMITS, Hermelijn H.; KAPSENBERG, Martien L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. In: **Springer seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2005. p. 289-307.
- DE OLIVEIRA-JUNIOR, Edgar Borges et al. Clinical and genotypic spectrum of chronic granulomatous disease in 71 Latin American patients: first report from the LASID registry. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 12, p. 2101-2107, 2015.
- DEFFERT, Christine; CACHAT, Julien; KRAUSE, Karl-Heinz. Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 8, p. 1168-1178, 2014.
- DENG, Jing et al. Protective role of reactive oxygen species in endotoxin-induced lung inflammation through modulation of IL-10 expression. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5734-5740, 2012.
- DINGJAN, Ilse et al. Oxidized phagosomal NOX2 complex is replenished from lysosomes. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 7, p. 1285-1298, 2017.
- DINGJAN, Ilse et al. Oxidized phagosomal NOX2 complex is replenished from lysosomes. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 7, p. 1285-1298, 2017.
- ELGUETA, Raul et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. **Immunological reviews**, v. 229, n. 1, p. 152-172, 2009.

ELSEN, Sylvie et al. Cryptic O<sub>2</sub>—generating NADPH oxidase in dendritic cells. **Journal of cell science**, v. 117, n. 11, p. 2215-2226, 2004.

FALCONE, E. Liana et al. Methylotroph infections and chronic granulomatous disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 404, 2016.

FERNANDEZ-BOYANAPALLI, Ruby et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in chronic granulomatous disease is reversed by IFN- $\gamma$  in a nitric oxide-dependent manner. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 7, p. 4030-4041, 2010a.

FERNANDEZ-BOYANAPALLI, Ruby et al. PPAR $\gamma$  activation normalizes resolution of acute sterile inflammation in murine chronic granulomatous disease. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 116, n. 22, p. 4512-4522, 2010b

FERNANDEZ-BOYANAPALLI, Ruby F. et al. Impaired apoptotic cell clearance in CGD due to altered macrophage programming is reversed by phosphatidylserine-dependent production of IL-4. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 113, n. 9, p. 2047-2055, 2009.

FREEMAN, Alexandra F. et al. Corticosteroids in the treatment of severe nocardia pneumonia in chronic granulomatous disease. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 30, n. 9, p. 806, 2011.

FUJINO, S. et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 65-70, 2003..

FUKAO, Taro; KOYASU, Shigeo. PI3K and negative regulation of TLR signaling. **Trends in immunology**, v. 24, n. 7, p. 358-363, 2003.

GABER, Timo; STREHL, Cindy; BUTTGEREIT, Frank. Metabolic regulation of inflammation. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 5, p. 267-279, 2017.

GEISZT, Miklós et al. Regulation of capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in human neutrophil granulocytes: alterations in chronic granulomatous disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 42, p. 26471-26478, 1997.

GEORGE-CHANDY, Annie et al. Th17 development and autoimmune arthritis in the absence of reactive oxygen species. **European journal of immunology**, v. 38, n. 4, p. 1118-1126, 2008.

GOLDBLATT, David et al. Chorioretinal lesions in patients and carriers of chronic granulomatous disease. **The Journal of pediatrics**, v. 134, n. 6, p. 780-783, 1999.

HEYWORTH, Paul G. et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update). **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 27, n. 1, p. 16-26, 2001.

HILLIGAN, Kerry L.; RONCHESE, Franca. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4<sup>+</sup> T helper cell responses. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 6, p. 587-599, 2020.

HORVATH, R. et al. Expansion of T helper type 17 lymphocytes in patients with chronic granulomatous disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 166, n. 1, p. 26-33, 2011.

HUNTER, Christopher A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 7, p. 521-531, 2005.

IBERG, Courtney A.; HAWIGER, Daniel. Natural and induced tolerogenic dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 204, n. 4, p. 733-744, 2020.

ILES, Karen E.; FORMAN, Henry Jay. Macrophage signaling and respiratory burst. **Immunologic research**, v. 26, n. 1, p. 95-105, 2002.

JANEWAY, Charles A. et al. Hypergammaglobulinemia associated with severe recurrent and chronic nonspecific infection. In: **American journal of diseases of children**. 515 N STATE ST, CHICAGO, IL 60610: AMER MEDICAL ASSOC, 1954. p. 388-392.

KALIŃSKI, Pawel et al. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunology today**, v. 20, n. 12, p. 561-567, 1999.

KAMALI, Ali N. et al. A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. **Molecular immunology**, v. 105, p. 107-115, 2019.

KIM, Ji Hyung et al. CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease. **Nature immunology**, v. 17, n. 10, p. 1159-1166, 2016.

KONTRAS, Stella B. et al. Interstitial cystitis in chronic granulomatous disease. **The Journal of Urology**, v. 105, n. 4, p. 575-578, 1971.

KREILEDER, Martina et al. Signaling dynamics regulating crosstalks between T-Cell activation and immune checkpoints. **Trends in Cell Biology**, v. 31, n. 3, p. 224-235, 2021.

KUHNS, Douglas B. et al. NCF1 (p47phox)-deficient chronic granulomatous disease: comprehensive genetic and flow cytometric analysis. **Blood advances**, v. 3, n. 2, p. 136-147, 2019.

LANDING, Benjamin H.; SHIRKEY, Harry S. A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes. **Pediatrics**, v. 20, n. 3, p. 431-438, 1957.

LAURENCE, Arian et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. **Immunity**, v. 26, n. 3, p. 371-381, 2007.

LEE, B. W.; YAP, H. K. Polyarthritis resembling juvenile rheumatoid arthritis in a girl with chronic granulomatous disease. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 37, n. 5, p. 773-776, 1994.

LEIDING, Jennifer W. et al. Corticosteroid therapy for liver abscess in chronic granulomatous disease. **Clinical infectious diseases**, v. 54, n. 5, p. 694-700, 2012.

LEIDING, Jennifer W.; HOLLAND, Steven M. Chronic granulomatous disease. **Stiehm's Immune Deficiencies**, p. 829-847, 2020.

LENT-SCHOCHET, Daniella; JIALAL, Ishwarlal. Chronic Granulomatous Disease. 2021.

LISTON, Adrian; MASTERS, Seth L. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 3, p. 208-214, 2017.

LOCK, Christopher et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. **Nature medicine**, v. 8, n. 5, p. 500-508, 2002.

LOZANOSKA-OCHSER, Biliana et al. Expression of CD86 on human islet endothelial cells facilitates T cell adhesion and migration. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6109-6116, 2008.

LUDEWIG, Burkhard et al. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF- $\alpha$ , but strongly enhanced by interleukin-10. **European journal of immunology**, v. 25, n. 7, p. 1943-1950, 1995.

MARCIANO, Beatriz E. et al. Common severe infections in chronic granulomatous disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 8, p. 1176-1183, 2015.

MARCIANO, Beatriz E. et al. Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease. **Pediatrics**, v. 114, n. 2, p. 462-468, 2004.

MATUTE, Juan D. et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 114, n. 15, p. 3309-3315, 2009.

MEISSNER, Felix et al. Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 116, n. 9, p. 1570-1573, 2010.

MIOSSEC, Pierre; KOLLS, Jay K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 10, p. 763-776, 2012.

- MURAKAMI, Masaaki; HIRANO, Toshio. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 323, 2012.
- NASEREDDIN, Aadeb et al. Bacillus Calmette–Guerin (BCG) vaccine-associated complications in immunodeficient patients following stem cell transplantation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 41, n. 1, p. 147-162, 2021.
- OHTANI, Masashi et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 112, n. 3, p. 635-643, 2008.
- O'SULLIVAN, Brendan; THOMAS, Ranjeny. CD40 and dendritic cell function. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 23, n. 1-2, 2003.
- PALESTINE, Alan G. et al. Ocular findings in patients with neutrophil dysfunction. **American Journal of Ophthalmology**, v. 95, n. 5, p. 598-604, 1983.
- PERONA-WRIGHT, Georgia et al. A pivotal role for CD40-mediated IL-6 production by dendritic cells during IL-17 induction in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 2808-2815, 2009.
- QUEZADA, Sergio A. et al. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 307-328, 2004.
- REHMAN, Z. U. et al. Dendritic cell harmonised immunity to poultry pathogens; a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 3, p. 581-590, 2017.
- REICHENBACH, Janine et al. Actinomyces in chronic granulomatous disease: an emerging and unanticipated pathogen. **Clinical infectious diseases**, v. 49, n. 11, p. 1703-1710, 2009.
- REIS E SOUSA, Caetano. Dendritic cells in a mature age. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 6, p. 476-483, 2006.
- RIEBER, Nikolaus et al. Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- ROOS, Dirk et al. Chronic granulomatous disease caused by mutations other than the common GT deletion in NCF1, the gene encoding the p47phox component of the phagocyte NADPH oxidase. **Human mutation**, v. 27, n. 12, p. 1218-1229, 2006.
- ROXO-JUNIOR, P.; SIMÃO, H. M. L. Chronic granulomatous disease: why an inflammatory disease?. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, p. 924-928, 2014.
- RYBICKA, Joanna M. et al. Phagosomal proteolysis in dendritic cells is modulated by NADPH oxidase in a pH-independent manner. **The EMBO journal**, v. 31, n. 4, p. 932-944, 2012.

SALLUSTO, Federica; LANZAVECCHIA, Antonio. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SALMEN, Siham et al. CD40/CD40L expression in leukocytes from chronic granulomatous disease patients. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 939-947, 2007.

SANFORD, A. N. et al. Abnormal apoptosis in chronic granulomatous disease and autoantibody production characteristic of lupus. **Rheumatology**, v. 45, n. 2, p. 178-181, 2006.

SCHRAML, Barbara U.; E SOUSA, Caetano Reis. Defining dendritic cells. **Current opinion in immunology**, v. 32, p. 13-20, 2015.

SEGAL, Anthony W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SEGAL, Brahm H. et al. Chronic granulomatous disease: lessons from a rare disorder. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 17, n. 1, p. S123-S131, 2011.

STEINMAN, Ralph M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 1-22, 2012.

STEINMAN, Ralph M.; YOUNG, James W. Signals arising from antigen-presenting cells. **Current opinion in immunology**, v. 3, n. 3, p. 361-372, 1991.

TANGYE, Stuart G. et al. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. **Journal of clinical immunology**, v. 40, n. 1, p. 24-64, 2020.

THOMAS, David C. et al. EROS/CYBC1 mutations: decreased NADPH oxidase function and chronic granulomatous disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. 782-785. e1, 2019.

THOMAS, David C. How the phagocyte NADPH oxidase regulates innate immunity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 125, p. 44-52, 2018.

THOMSEN, Isaac P. et al. A comprehensive approach to the management of children and adults with chronic granulomatous disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 6, p. 1082-1088, 2016.

VAN DE GEER, Annemarie et al. Inherited p40 phox deficiency differs from classic chronic granulomatous disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 9, p. 3957-3975, 2018.

VAN DE VEERDONK, Frank L. et al. Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1 $\beta$  inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 7, p. 3030-3033, 2010.

VAN DEN BERG, J. Merlijn et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5234, 2009.

VERMOT, Annelise et al. NADPH oxidases (NOX): An overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 890, 2021.

VOWELLS, S. J. et al. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. **Journal of immunological methods**, v. 178, n. 1, p. 89-97, 1995.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, n. 1, p. 45-65, 2003.

WALTHER, McClellan M. et al. The urological manifestations of chronic granulomatous disease. **The Journal of urology**, v. 147, n. 5, p. 1314-1318, 1992.

WANG, Chao et al. Bioengineering of artificial antigen presenting cells and lymphoid organs. **Theranostics**, v. 7, n. 14, p. 3504, 2017.

WEAVER, Casey T. et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, v. 24, n. 6, p. 677-688, 2006.

WEAVER, Casey T. et al. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, p. 477-512, 2013.

WEI, Ang et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis resulting from a cytokine storm triggered by septicemia in a child with chronic granuloma disease: a case report and literature review. **BMC pediatrics**, v. 20, n. 1, p. 1-4, 2020.

WILSON, Nicholas J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nature immunology**, v. 8, n. 9, p. 950-957, 2007.

WINKELSTEIN, Jerry A. et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. **Medicine**, v. 79, n. 3, p. 155-169, 2000.

WINZLER, Claudia et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 2, p. 317-328, 1997.

WORBS, Tim; HAMMERSCHMIDT, Swantje I.; FÖRSTER, Reinhold. Dendritic cell migration in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 30-48, 2017.

YANG, Xiang-Ping et al. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. **Nature immunology**, v. 12, n. 3, p. 247-254, 2011.

YU, Hsin-Hui; YANG, Yao-Hsu; CHIANG, Bor-Luen. Chronic granulomatous disease: a comprehensive review. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 61, n. 2, p. 101-113, 2021.

YU, Joyce E. et al. Considerations in the diagnosis of chronic granulomatous disease. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 7, n. suppl\_1, p. S6-S11, 2018.

ZANNA, Mohammed Yusuf et al. Review of dendritic cells, their role in clinical immunology, and distribution in various animal species. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, p. 8044, 2021.

ZERBE, Christa S.; MARCIANO, B.; HOLLAND, Steven M. Chronic granulomatous disease: pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis. **UpToDate**, 2020.

ZHANG, Jin-Song et al. NF- $\kappa$ B regulates the LPS-induced expression of interleukin 12 p40 in murine peritoneal macrophages: roles of PKC, PKA, ERK, p38 MAPK, and proteasome. **Cellular immunology**, v. 204, n. 1, p. 38-45, 2000.

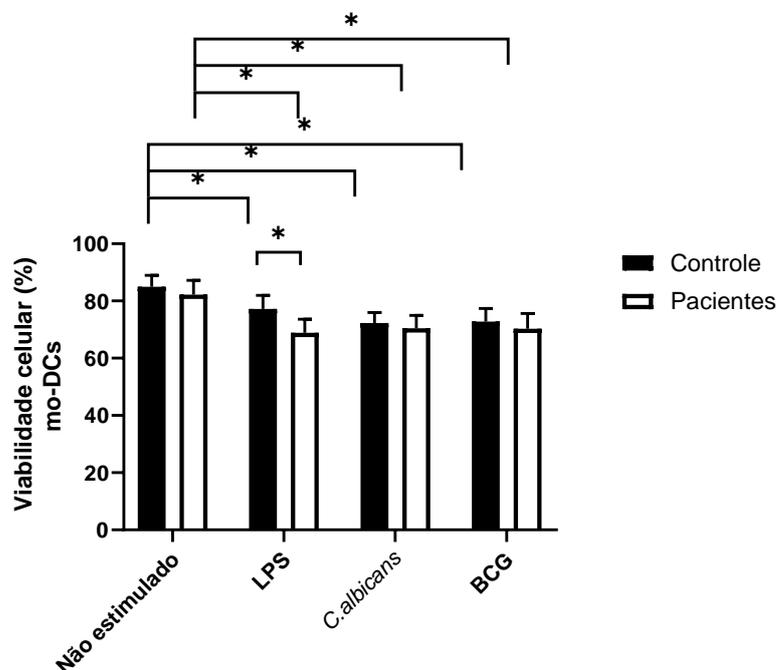
## APÊNCIDE A

Visando saber se o tempo de cultura e os estímulos com LPS, BCG e *Candida albicans* estavam comprometendo a integridade das células, avaliamos a viabilidade celular pelo ensaio de exclusão colorimétrica com azul de tripan 0,4%.

Os monócitos de indivíduos saudáveis e pacientes DGC foram dispostos nas placas de cultura com 100% de viabilidade celular. Contudo, após 5 dias de cultura, a viabilidade de mo-DCs imaturas reduziu para 82,21% em pacientes DGC e 84,98% em indivíduos saudáveis.

A ativação celular com LPS, *Candida albicans* e BCG reduziu a viabilidade de mo-DCs de pacientes DGC e indivíduos saudáveis. O LPS reduziu significativamente a viabilidade em pacientes DGC (68,83%) quando comparado com indivíduos saudáveis (77,21%). A viabilidade celular após a ativação *Candida albicans* e BCG diminuíram para 70,46% e 70,32% em pacientes DGC e 72,28% e 72,817% em indivíduos saudáveis, respectivamente (**Figura suplementar 1**).

**Figura suplementar 1.** Viabilidade celular de mo-DCs não estimuladas e estimuladas com LPS, BCG e *Candida albicans*.



As expressões das moléculas foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo, sendo utilizado a análise Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's (n=11),  $p < 0,05$ . Não estimulado: mo-DCs imaturas; LPS: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com 100ng/mL de LPS; *C.albicans*: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com MOI 2:1 de *Candida albicans*; BCG: células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com MOI 5:1 de BCG.

## Apêndice B

### REVIEW



# The extended understanding of chronic granulomatous disease

Raissa Lacerda-Pontes<sup>a</sup>, Lillian Nunes Gomes<sup>a</sup>,  
Rafael Sales de Albuquerque<sup>a</sup>, Paulo Vitor Soeiro-Pereira<sup>b</sup>,  
and Antonio Condino-Neto<sup>a</sup>

#### Purpose of review

We briefly address the advances in genetics, pathophysiology, and phenotypes of chronic granulomatous disease (CGD). This is one of the most studied primary immunodeficiencies, which comprise mutations in genes encoding the different subunits of the NADPH oxidase system. Those mutations lead to defective reactive oxygen species production, and consequently a failure to eliminate pathogens.

#### Recent findings

Patients with CGD are susceptible to fungal, bacterial, and parasitic infections. Other symptoms, as systemic adverse effects to BCG vaccine and hyperinflammation, are also important clinical conditions in this disease. This wide-ranging clinical spectrum of CGD comes from heterogeneity of mutations, X-linked-CGD or autosomal recessive inheritance, and diverse environmental pressure factors. Early accurate diagnosis and prompt treatment are necessary to diminish the consequences of the disease. The most used diagnostic tests are dihydrorhodamine, cytochrome c reduction, and luminol-enhanced chemiluminescence assay.

#### Summary

The determination of mutations is essential for diagnosis confirmation and genetic counseling. CGD treatment usually includes prophylactic antibiotics and antifungals. Prophylactic recombinant human interferon- $\gamma$ , immunosuppressors or immune modulators may be, respectively, indicated for preventing infections or inflammatory manifestations. Hematopoietic stem cell transplantation and gene therapy are currently the available options for curative treatment of CGD.

#### Keywords

diagnosis, gene therapy, infections, inflammation, primary immunodeficiency

## INTRODUCTION

Chronic granulomatous disease (CGD) (OMIM #306400, #233690, #233700, #233710, #608203) is a primary immunodeficiency (PID), characterized by the failure of phagocytes to eliminate pathogens. This functional failure is caused by mutations in genes encoding the subunits of the phagocyte NADPH oxidase system, responsible for generating reactive oxygen species (ROS) [1]. Patients with CGD (X-linked or autosomal) are susceptible to fungal, bacterial, and rarely parasitic infections. These patients may also present with granulomas and systemic hyperinflammation [2].

Retrospective studies in the United States [3], Europe [4], and Latin America [5] found an estimated CGD incidence of 1:200 000 live births per year. There is a predominance of boys affected because of the characteristic of X-linked inheritance. The

incidence, although not significantly different among distinct cultural and ethnic groups, may increase as a result of consanguineous marriages.

In this review, we succinctly address the genetics and pathophysiology of CGD, and discuss the advantages of rapid and adequate diagnosis, as well as treatment perspectives for CGD patients.

<sup>a</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo and <sup>b</sup>Department of Pathology, Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão Medical School, São Luís, Brazil

Correspondence to Antonio Condino-Neto, MD, PhD, FAAAAI, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 1730 Lineu Prestes Avenue, São Paulo (SP), ZIP 05508-000, Brazil. Tel: +55 11 3091 7435; e-mail: antoniocondino@gmail.com

**Curr Opin Pediatr** 2019, 31:869–873

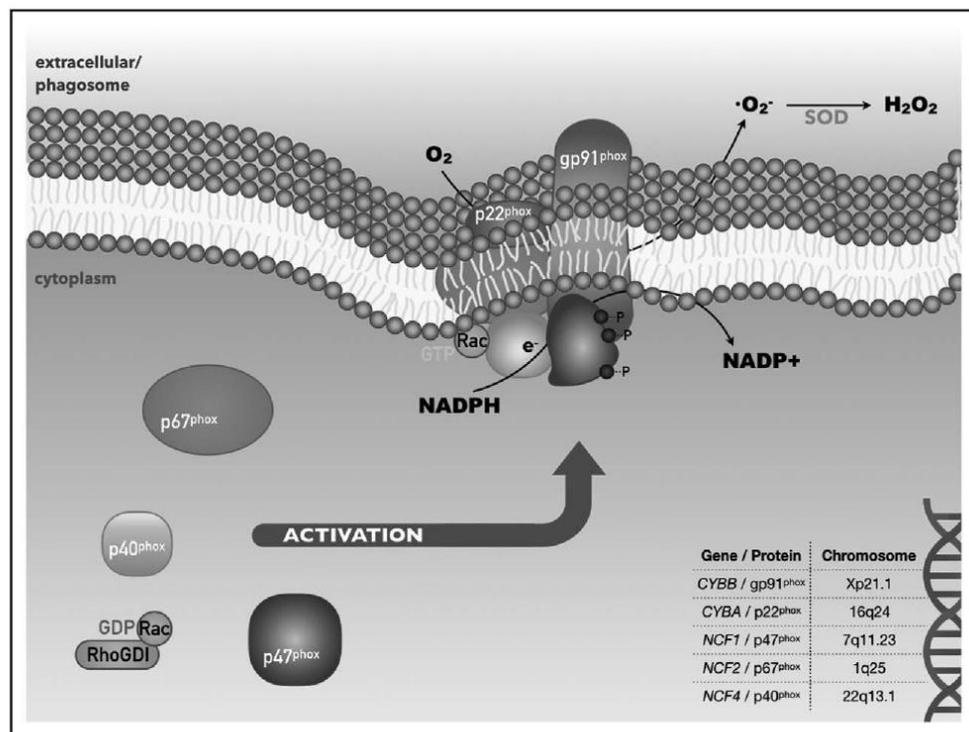
DOI:10.1097/MOP.0000000000000830

**KEY POINTS**

- CDG presents different phenotypes because of distinct mutations patterns.
- Inflammatory manifestations have been described as important in some CGD patients.
- The use of immune modulators, as human recombinant interferon  $\gamma$ , should also be considered for treating CGD patients.
- Despite early difficulties, gene therapy is close to be a real option for CGD treatment.

**WHY SO DIFFERENT?: MUTATIONS AND PHENOTYPES**

Mutations in any of the genes encoding the different subunits of the NADPH oxidase enzymatic complex lead to a broad spectrum of clinical manifestations in CGD. These may consist of an X-linked recessive disorder (XL-CGD) affecting *CYBB* gene encoding the gp91phox protein, as well as autosomal recessive disorders concerning *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* or *NCF4* genes encoding, respectively, p22phox, p47phox, p67phox, and p40phox [6\*\*\*] (Fig. 1). XL-CGD covers about 60% of the total number of cases. Among autosomal recessive, approximately 30% of cases are defects in *NCF2* and 10% in *CYBA*, *NCF1*, and *NCF4* [7]. The diversity of these mutations and the multiple affected genes explain the clinical and



**FIGURE 1.** Schematic overview of NADPH oxidase enzymatic complex activation and assemble in plasma or phagosomal membrane. Phagocytes NADPH oxidase complex contains two subunits, p22phox and gp91phox, forming cytochrome *b*<sub>558</sub>, on the plasma or phagosomal membrane. After activation by natural [phagocytosis, cytokines, and damage-associated molecular patterns (DAMPs)] or synthetic [phorbol-myristate-acetate (PMA)] stimuli, cytosolic components, p47phox, p67phox, and p40phox, are phosphorylated and assembled with Cyt *b*<sub>558</sub> at the membrane. Also, Rac proteins are associated with regulated NADPH oxidase function. Activated NADPH oxidase system transfers an electron from NADPH to molecular oxygen and generates superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), which will be converted to hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by superoxide dismutase (SOD). Both reactive oxygen species are essential for an adequate phagocyte microbicidal activity.

genetic heterogeneity. Patients with gp91phox, p22phox, p47phox, or p67phox deficiency have a 'classic' form of CGD, characterized by functional impairment of neutrophils and mononuclear phagocytes (monocytes, macrophages, and dendritic cells), resulting in systemic and recurrent infections, mainly caused by bacteria and fungi, such as *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens*, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* [8]. On the contrary, p40phox deficiency patients have an atypical form, with mononuclear phagocytes capable of synthesizing ROS in response to fungi and bacteria, whereas neutrophils respond only to fungal stimuli. Thus, these patients have a less severe clinical picture; however, they present with a high incidence of inflammatory bowel disease [9]. Common manifestations to both clinical forms are the presence of hepatic and/or pulmonary abscesses, suppurative lymphadenitis, diarrheal enteritis, and severe systemic infections, as osteomyelitis or septicemia [5].

Recent studies also reveal the susceptibility to *Mycobacterium bovis* present in BCG vaccine, which promotes immunization against tuberculosis in neonates. A cohort of 169 patients with CGD revealed an incidence of BCGitis in 59.2% of patients [10]. Among the most common complications are the cutaneous manifestations, ulcerations, and fistulizations. Dissemination of Bacillus Calmette–Guérin to lung, liver, bone, or brain represents the most dangerous event after this vaccine, with a mortality rate between 60 and 80% [11].

Adverse events following BCG immunization include serious clinical conditions. These manifestations may be followed by more severe infections by pathogenic mycobacterial species, such as *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). In this case, innate immunity not only initiates a series of events to aid adaptive immunity, but also restricts the growth of Mtb bacilli in the early phase of infection. Failure of innate killing mechanisms results in Mtb free growth, determining conditions for the pathogen to break through the immune system barrier [12].

Beyond susceptibility to infections, CGD symptoms include increased inflammatory responses, even in the absence of infectious agents (sterile inflammation). Inflammatory bowel disease is frequent in patients with p40phox deficiency [9,13]. However, the mechanisms behind hyperinflammation are not clearly understood.

### INFLAMMATORY COMPLICATIONS IN A CONTEXT FAILURE OF IMMUNE RESPONSE

There is a complex relationship between infection and inflammation. This is a physiological process

involved in the organism homeostasis. This response is generally self-regulated and limited to the elimination of the initial stimulus, pathogenic or not [14]. However, inflammatory disorders occur with the exacerbation of inflammation or failure to regulate it [15]. Thus, hyperinflammation is characterized by apparently spontaneous inflammatory episodes, mainly mediated by the innate immune system [16].

In the context of CGD patients, the activity of the NADPH oxidase system is considered as a microbicidal mechanism and a regulator of inflammation [17,18]. Thus, the impairment of ROS production may culminate in the dysregulation of the inflammatory response. In an experimental model, defects in p47phox and gp91phox led mice exposed to lipopolysaccharide and zymosan (intratracheal route) to increased the activation of nuclear factor kappa B and production of proinflammatory cytokines [tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-17, and granulocyte-colony stimulating factor], resulting in pulmonary hyperinflammation [19].

Furthermore, some studies indicate other possible mechanisms that induce hyperinflammation, such as reduced neutrophil apoptosis, innate immune receptor imbalance, Th17 cell induction, decreased Nrf2 activity, and increased inflammation activation [20]. The most common inflammatory complications in CGD patients are granuloma formation, with the gastrointestinal tract affected in 88% of patients, followed by lungs (26.4%), urogenital tract (17.6%), and eyes (8.8%). Other organs, such as skin, central nervous system, tympanic membrane, and autoimmune manifestations (lupus and arthritis), are less frequent [21]. In any case, the exacerbated inflammatory process in some CGD patients is fundamental for differential diagnosis and treatment/diagnosis of the disease.

### HOW TO FIND AND TREAT A CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE PATIENT?

CGD diagnosis is based on the recognition of conventional or uncommon clinical manifestations and on laboratory evaluation of reactive oxygen species production. The most common technique used is dihydrorhodamine assay, a semiquantitative assay that assesses the fluorescence following the conversion of dihydrorhodamine123 to rhodamine 123 in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by flow cytometry [22]. Nitro blue tetrazolium assay consists of a qualitative light microscopy assay, in which superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) reduces nitroblue tetrazolium into nitroblue formazan [23]. Quantitative tests, such as cytochrome c reduction and luminol-enhanced chemiluminescence, are also used in CGD diagnosis. The first

## Allergy, immunology and related disorders

one cytochrome *c* reduction is based on stoichiometric reduction of ferricytochrome *c* in the presence of  $O_2^-$  increasing spectrum sensitivity at 549.5 nm [24]. The luminol-enhanced chemiluminescence, in turn, detects intra and extracellular ROS production. Gene sequencing is also recommended in order to identify the genetic variant for genetic counseling [22].

Correct and early diagnosis is important for proper treatment, thus improving the patient's quality of life. CGD treatment includes prophylactic antibiotics and antifungals. Antibacterial prophylaxis includes sulfamethoxazole (30 mg/kg/day) and trimethoprim (6 mg/kg/day) [25]. In cases of sulfonamide allergic manifestations, suitable alternatives are ciprofloxacin or cephalosporin. The azole class (itraconazole, voriconazole, and posaconazole) is indicated as the first choice for antifungal prophylaxis, showing the high efficacy against *Aspergillus* spp [8]. For fungal infections, prophylactic treatment with itraconazole is the most appropriate, 100 mg/day for patients under 13 years or weighing less than 50 kg. For patients weighing 50 kg or more and 13 years of age or older, the recommended dose is 200 mg/day [26]. Recombinant human interferon- $\gamma$  therapy, a cytokine produced by T lymphocytes and natural killer cells capable of activating macrophages, is included for some patients. The treatment consists of 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  IFN- $\gamma$  for 2 days, which promotes a better splicing efficiency of gp91phox transcripts, resulting in increased expression of cytochrome b, allowing higher levels of  $O_2^-$  production and neutrophil bactericidal activity and monocytes [27].

Advances in treatments have resulted in increased patient survival. Pioneering studies on CGD described mortality above 50% at 6 years of age and almost 65% at 7 years [28]. Despite improved patient survival, the mortality rate is still high [21]. Along with the increased life expectancy of these patients, inflammatory complications emerged. A 30-year retrospective study reported that patients had the first inflammatory manifestations only at 20 years of age [21].

In the context of inflammatory complications in CGD patients, the treatment requires the moderate use of immunosuppressors to avoid compromising immune defense. The first choice of treatment is steroids such as prednisone (1 mg/kg/day) in which one recommends a gradual dose reduction to 0.25 mg/kg every other day between 12 and 20 weeks. However, the chance of inflammatory relapse is high, up to 70% [26]. Apart from that, it is essential to raise the awareness about the risk of possible infections.

Alternatively, colitis can be treated using biologicals. The use of TNF- $\alpha$  blockers (Infliximab 5 mg/kg) acts in blocking the recruitment and activation of monocytes and neutrophils [29], however, with

high risk of promoting overwhelming infections. Treatment with IL-1 receptor blocker (Anakinra) results in rapid improvement, restoring mechanisms, such as autophagy, and reducing inflammation [30], however, also increasing the risk of fatal fungal and bacterial infections [31].

Despite the available therapies, the consequences of long-term treatments remain unknown, especially in patients with no neutrophil oxidative activity. Consequently, a constant search for definitive therapies, such as hematopoietic cell transplantation and gene therapy, are currently in progress.

### ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION AND GENE THERAPY

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is currently the curative treatment for CGD patients, as for other PID individuals. However, it remains a great challenge and is available to few patients because of scarce bone marrow donors in national registries and the risk of graft versus host disease. Pretransplant conditioning, as well as patient age and clinical condition, directly influence posttransplant mortality risks [32].

For transplantation in CGD children, a compatible sibling is preferable as a donor, in the absence of an human leukocyte antigen-matched unrelated donor [33]. Also, the use of an unrelated, haploidentical, or cord blood donors depends on the center's experience [34]. Despite all risks involved, HSCT is the most tangible definitive treatment for this group of patients.

In the last 20 years, gene therapy has been developed as a possibility for permanent cure of CGD patients. Briefly, gene therapy for CGD is based on restoration of the missing or dysfunctional NADPH oxidase subunit through lentiviral vector transduction [35]. The *CYBB* gene has been the main target of 'correction' by gene therapy because of the prevalence of gp91phox subunit defects [21].

The vectors currently used are the long terminal repeat of the human immunodeficiency virus with deletion of the U3 segment, which attributed the self-inactivity to these vectors. Promoter regions are derived from cytomegalovirus or native promoters of the gene of interest or related genes [36]. Despite early difficulties, advances in gene therapy can provide definitive treatment for patients with CGD, not only for patients with *CYBB* mutations but also those with autosomal recessive forms of CGD.

### CONCLUSION

The clinical manifestations of patients with CGD are more diverse and relevant than originally

anticipated. The increased survival of patients with CGD has presented new challenges, such as the symptoms of hyper inflammation. However, new therapeutic possibilities, such as the use of recombinant cytokines and gene therapy, together with more sensitive and rapid diagnostic techniques, have helped to improve the prognosis of these patients.

### Acknowledgements

None.

### Financial support and sponsorship

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Jeffrey Modell Foundation

### Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

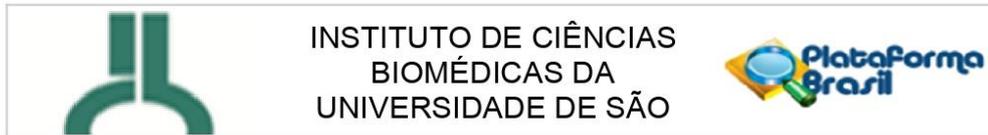
## REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Roos D, Tool ATJ, van Leeuwen K, *et al.* Biochemical and genetic diagnosis of chronic granulomatous disease. In: Seger RA, Roos D, Segal B, Kuijpers TW, editors. *Chronic Granulomatous Disease - Genetics, Biology and Clinical Management*, 1st. New York, NY, USA: Nova Biomedical; 2017. pp. 231–300.
2. Parvaneh N, Barlogis V, Alborzi A, *et al.* Visceral leishmaniasis in two patients with IL-12p40 and IL-12Rβ1 deficiencies. *Pediatr Blood Cancer* 2017; 64:e26362.
3. Angelino G, De Angelis P, Faraci S, *et al.* Inflammatory bowel disease in chronic granulomatous disease: an emerging problem over a twenty years' experience. *Pediatr Allergy Immunol* 2017; 28:801–809.
4. van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, *et al.* Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One* 2009; 4:e5234.
5. de Oliveira-Junior EB, Zurro NB, Prando C, *et al.* Clinical and genotypic spectrum of chronic granulomatous disease in 71 Latin American Patients: first report from the LASID Registry. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62:2101–2107.
6. Lent-Schochet D, Jialal I. *Chronic Granulomatous Disease*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2019.
- CGD is a rare heterogeneous condition described as a series of recurrent life-threatening infections.
7. Matute JD, Arias AA, Wright NA, *et al.* A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* 2009; 114:3309–3315.
8. Arnold DE, Heimal JJR. A review of chronic granulomatous disease. *Adv Ther* 2017; 34:2543–2557.
9. Van De Geer A, Nieto-Patlán A, Kuhns DB, *et al.* Inherited p40 phox deficiency ■ differs from classic chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 2018; 128:3957–3975.
- Inherited p40phox deficiency underlies a distinctive condition, resembling a mild, atypical form of CGD.
10. Zhou Q, Hui X, Ying W, *et al.* A cohort of 169 chronic granulomatous disease ■ patients exposed to BCG vaccination: a retrospective study from a single center in Shanghai, China (2004–2017). *J Clin Immunol* 2018; 38:260–272. BCG infections were a clinical challenge unique to China.

11. Li T, Zhou X, Ling Y, *et al.* Genetic and clinical profiles of disseminated ■ Bacillus Calmette-Guérin disease and chronic granulomatous disease in China. *Front Immunol* 2019; 10:73.
- The extent of BCG spreading is strongly associated with clinical outcomes, and HSCT may be a therapeutic option for this condition.
12. Khan N, Vidyarthi A, Javed S, Agrewala JN. Innate immunity holding the flanks until reinforced by adaptive immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Front Microb* 2016; 7:328.
13. Qualls JE, Kaplan AM, van Rooijen N, Cohen DA. Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 2006; 80:802–815.
14. Dryden M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 51:299–303.
- This paper compiles data that establish ROS as fundamental antimicrobials of physiological response and its application as a topical therapy.
15. Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol* 2012; 22:733–740.
16. Weaver LK, Behrens EM. Hyperinflammation, rather than hemophagocytosis, is the common link between macrophage activation syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26:562–569.
17. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, *et al.* Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev* 2016; 273:180–193.
18. Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, *et al.* Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochem Pharmacol* 2011; 81:636–648.
19. Segal BH, Han W, Bushey JJ, *et al.* NADPH oxidase limits innate immune responses in the lungs in mice. *PLoS One* 2010; 5:e9631.
20. Rieber N, Hector A, Kuijpers T, *et al.* Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012:1–6.
21. Magrani A, Brosselin P, Beauté J, *et al.* Inflammatory manifestations in a single-center cohort of patients with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:655–662.
22. Roos D, De Boer M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol* 2014; 175:139–149.
23. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem* 2006; 27:31–44.
24. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, *et al.* Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79:155–169.
25. Seger A. Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol* 2008; 140:255–266.
26. Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, *et al.* Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 2004; 39:692–699.
27. Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood* 2000; 95:3548–3554.
28. Johnston RB Jr, Baehner RL. Chronic granulomatous disease: correlation between pathogenesis and clinical findings. *Pediatrics* 1971; 48:730–739.
29. Sandborn WJ. Optimizing antitumor necrosis factor strategies in inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5:501–505.
30. de Luca A, Smeekens SP, Casagrande A, *et al.* IL-1 receptor blockade restores autophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:3526–3531.
31. Uzel G, Orange JS, Poliak N, *et al.* Complications of tumor necrosis factor-α blockade in chronic granulomatous disease-related colitis. *Clin Infect Dis* 2010; 51:1429–1434.
32. Cole T, Pearce MS, Cant AJ, *et al.* Clinical outcome in children with chronic granulomatous disease managed conservatively or with hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:1150–1155.
33. McCurdy SR, Fuchs EJ. Selecting the best haploidentical donor. *Semin Hematol* 2016; 53:246–251.
34. Parta M, Kelly C, Kwatema N, *et al.* Allogeneic, reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease: a single-center prospective trial. *J Clin Immunol* 2017; 37:548–558.
35. Santilli G, Almaraz E, Brendel C, *et al.* Biochemical correction of X-CGD by a novel chimeric promoter regulating high levels of transgene expression in myeloid cells. *Mol Ther* 2011; 19:122–132.
36. Keller MD, Notarangelo LD, Malech HL. Future of care for patients with chronic granulomatous disease: gene therapy and targeted molecular medicine. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2018; 7:40–44.
- Novel targeted treatments for inflammatory complications in patients with chronic granulomatous disease.

Anexo A**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Caracterização clínica, imunológica e genética de pacientes com suscetibilidade a infecções recorrentes ou oportunistas sem causa definida

**Pesquisador:** Antonio Condino Neto

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 51097615.0.0000.5467

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.546.076

**Apresentação do Projeto:**

resposta a solicitações feitas para a Comissão de Ética

**Objetivo da Pesquisa:**

Caracterização clínica, imunológica e genética de pacientes com suscetibilidade a infecções recorrentes ou oportunistas sem causa definida

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

benefícios superam os riscos que estão restritos à coleta de sangue

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O pesquisador responsável fez as alterações solicitadas por esta Comissão no que se refere à informações a serem adicionada ao projeto inicial e à nova redação de TCLE

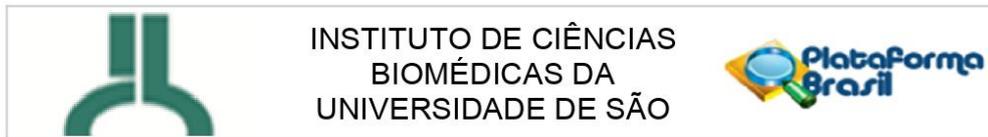
**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os itens solicitados foram entregues

**Recomendações:**

aprovar o projeto

**Endereço:** Av. Prof Lineu Prestes, 2415  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7733 **Fax:** (11)3091-8405 **E-mail:** cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 1.546.076

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

projeto aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

De acordo com o parecer de relator e parecer consubstanciado já constante no processo e dada a explicação para pendência dada pelo pesquisador, o Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_597830.pdf	10/05/2016 06:32:42		Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	10/05/2016 06:30:09	Antonio Condino Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEs.pdf	10/05/2016 06:28:52	Antonio Condino Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.pdf	10/05/2016 06:28:15	Antonio Condino Neto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	01/10/2015 14:17:26	Antonio Condino Neto	Aceito

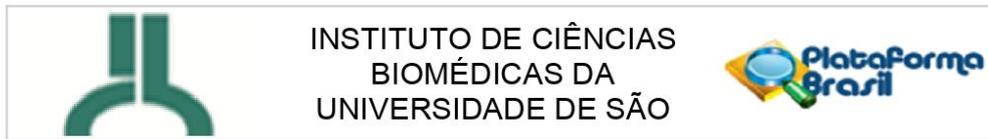
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. Profª Lineu Prestes, 2415  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7733 **Fax:** (11)3091-8405 **E-mail:** cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 1.546.076

SAO PAULO, 13 de Maio de 2016

---

**Assinado por:**  
**Regina Scivoletto**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Profª Lineu Prestes, 2415  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7733 **Fax:** (11)3091-8405 **E-mail:** cep@icb.usp.br