

DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PACIENTES COM DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO SUL DO BRASIL

Leonardo Martinello da Rosa^{1,2}; Martha Braun da Rosa²; Mariana Sampaio Leite Jobim Wilson³; Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{1,2}; Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}

¹ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental, Laboratório BRAIN – *Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences*;
² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular;
³ Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Contato: fsperb@gmail.com

INTRODUÇÃO

A Doença Granulomatosa Crônica (DGC) é um erro inato da imunidade raro causado por defeitos genéticos no complexo NADPH oxidase em fagócitos, que produz espécies reativas de oxigênio, essencial na eliminação de patógenos. Pacientes com DGC sofrem de infecções recorrentes, autoimunidade, hiperinflamação e malignidades.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi o diagnóstico genético de pacientes com suspeita de DGC, através de informações clínicas e sequenciamento massivo paralelo.

METODOLOGIA

Seis pacientes (P1 a P6) do sexo masculino atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), tiveram coletados seus dados clínicos, e sangue para extração de DNA. O sequenciamento massivo paralelo foi realizado com painel para os genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*, e sequenciamento completo do genoma. A técnica de gene-scan foi usada para diferenciar o gene *NCF1* de pseudogenes (psNCF1) não funcionais, para identificar a variante p.Tyr26HisfsTer (delGT). Variantes foram classificadas pelos critérios da ACMG e ClinGen. O impacto estrutural de variantes de troca de sentido foi avaliado nos softwares PyMOL e Fold-X. Sequências da proteína gp91phox (*CYBB*) de 10 diferentes espécies foram obtidas no Ensembl para um alinhamento múltiplo realizado no software MUSCLE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as manifestações clínicas observadas, os órgãos mais afetados foram os pulmões (100%, n = 6), a pele (66%, n = 4) e linfonodos (66%, n = 4), envolvendo infecções de repetição e pneumonias recorrentes observadas em todos os pacientes (Fig. 1).

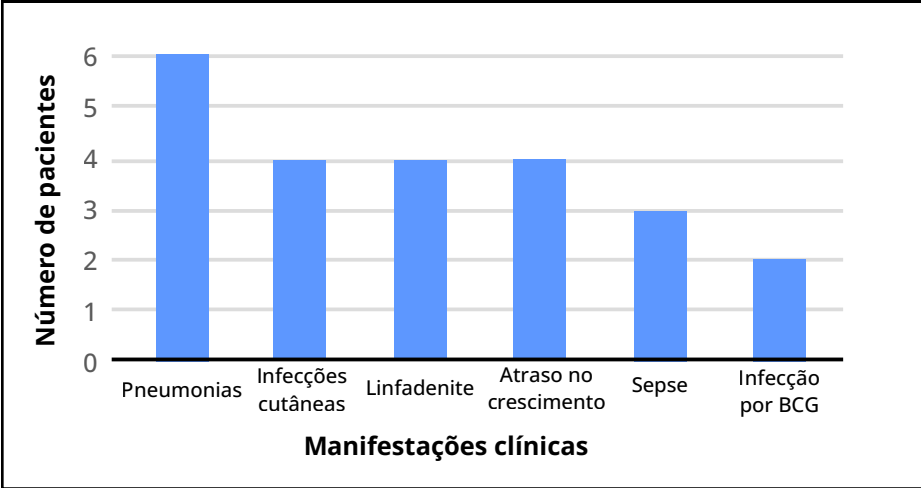


Figura 1. Manifestações clínicas mais comuns observadas nos pacientes P1-P6.

A média de idade ao diagnóstico genético foi de 13,1 anos (1-39 anos). P1 e P3 tiveram reações à vacina BCG. Dados genéticos dos pacientes P1 a P6 estão apresentados na Tabela 1. As variantes em *CYBB* de P1 e P2 ocorrem num resíduo de cisteína altamente conservado (Fig. 2). A delGT em *NCF1* foi identificada em P5 (homozigoto) e P6 (heterozigoto), irmãos de pais consanguíneos (Fig. 3).

Tabela 1: Informações genéticas de 6 pacientes diagnosticados com DGC

Paciente / Variante	Classificação	Bioinformática
1	CYBB:p.Cys257Ser*	Prov. Patogênica
2	CYBB:p.Cys257Arg	Prov. Patogênica
3	CYBB:p.Arg157Ter#	Patogênica
4	CYBB:p.Trp483Ter#	Patogênica
5*	NCF1:p.Tyr26HisfsTer	Patogênica
6*	NCF1:p.Tyr26HisfsTer	Patogênica

* - Variante inédita na literatura. EG - Energia livre de Gibbs obtidos por modelagem tridimensional (VR:>1,6 kcal/mol sugerem impacto estrutural); # - NMD, decaimento de mRNA mediado por códon de parada prematuro; + - consanguinidade.

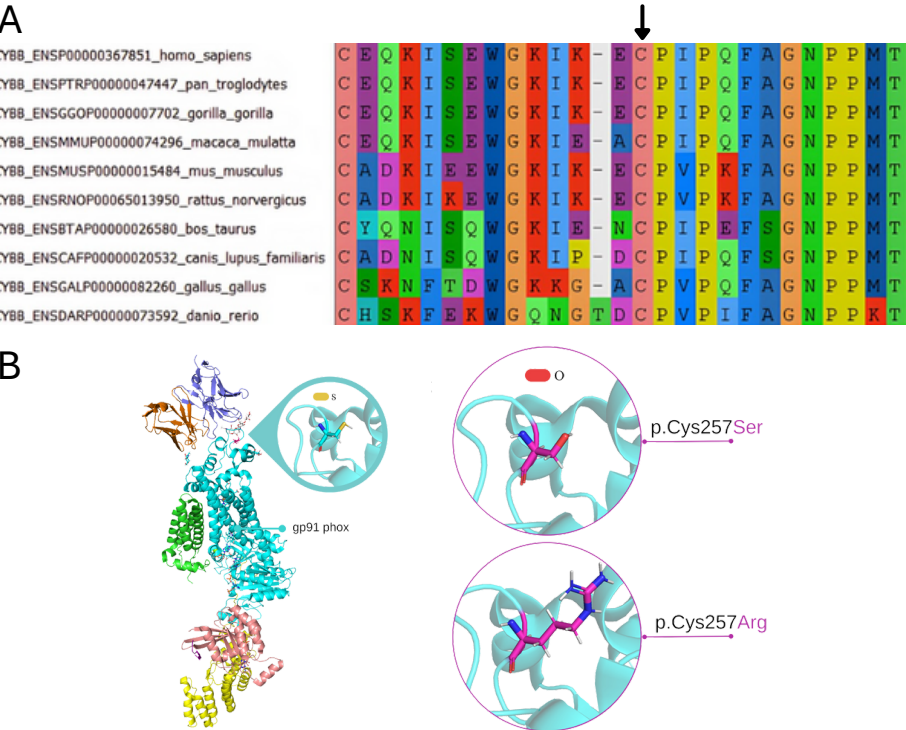


Figura 2. A - Resíduo Cys257 (indicado pela flecha) conservado em 10 diferentes espécies. B - Modelagem das variantes no resíduo altamente conservado Cys257.

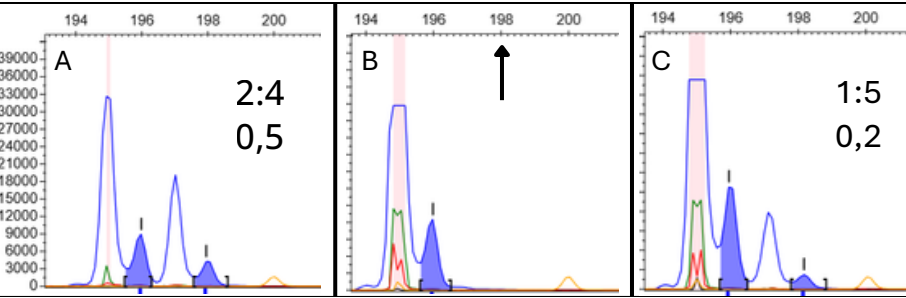


Figura 3. Resultados do gene-scan (picos em azul). A - Paciente controle; B - Paciente 5 homozigoto para a delGT pela ausência de *NCF1* funcional (198pb); C - Paciente 6 heterozigoto para a delGT.

O gene *CYBB* soma cerca de 2/3 dos casos de DGC, e está atrelado aos casos mais graves da doença, afetando majoritariamente homens. A delGT em *NCF1* representa mais de 90% dos casos autossômicos recessivos da DGC, apresentando formas mais leves da doença. Como nenhuma outra variante em P6 foi identificada nas análises, possivelmente o paciente tenha um psNCF1 sem a delGT, que surgiu devido à recombinação desigual entre *NCF1*, confundindo a análise e indicando heterozigose da delGT, diferenciando o genótipo entre os irmãos.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo de diagnóstico da DGC no sul do país e reforça a importância de diagnósticos precoces para fim de odisséias diagnósticas, realização de tratamento adequado e do encaminhamento para transplante de medula óssea, prevenindo desfechos fatais, e para contraindicar a vacina BCG para pacientes com DGC.