

ROSEMEIRE NAVICKAS CONSTANTINO DA SILVA

**Avaliação funcional de fagócitos em
imunodeficiências com
manifestações cutâneas**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor**

Programa de: Dermatologia

**Orientadora: Profa. Dra. Anete
Sevciovic Grumach**

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

‘©reprodução autorizada pelo autor

Constantino-Silva, Rosemeire Navickas
Avaliação funcional de fagócitos em imunodeficiências com manifestações
cutâneas / Rosemeire Navickas Constantino da Silva. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.
Orientadora: Anete Sevciovic Grumach.

Descritores: 1.Fagócitos 2.Candidíase mucocutânea crônica 3.Doença
granulomatosa crônica 4.Manifestações cutâneas 5.Fagocitose 6.Portadores de
doença granulomatosa crônica 7.Atividade bactericida de fagócitos 8.Atividade
fungicida de fagócitos

USP/FM/DBD-298/10

Rosemeire Navickas Constantino da Silva

Avaliação funcional de fagócitos em
imunodeficiências com manifestações cutâneas.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Anete
Sevciovic Grumach

Aprovado em:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Não penses mal dos que procedem mal; pensa somente que estão equivocados”.

Sócrates

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

Dedicatória

Dedico este trabalho...

... Ao meu querido pai Oswaldo Benedicto Constantino que mesmo não estando de corpo presente, sei que sempre está ao meu lado, em todos os meus momentos, amparando-me e guiando-me, sigo o exemplo de simplicidade e amor que me deixou quando em vida, que serve para me erguer cada vez que me sinto sem forças.....

Obrigada meu querido e amado PAI por tudo que fizeste por mim e que sei que continua fazendo.

...A minha querida e guerreira MÃE Milda Navickas Constantino, exemplo de vida a ser seguido, coração enorme de bondade e amor, obrigada por ter sido tão forte todo tempo e ter me ensinado a transpor barreiras e a seguir sempre em frente com honestidade e caráter.

Obrigada MÃE QUERIDA pela vida que me deste e tudo o que me ensinaste.

Agradecimentos

Agradecimento Especial

Primeiramente a DEUS pois sem sua permissão não teria sido possível nada deste trabalho e nem a minha vida, a fé faz com que tenhamos forças quando encontramos pessoas difíceis ou barreiras em nossa jornada.

OBRIGADA SENHOR por existir em minha vida....

Ao meu querido e amado esposo Gilson André da Silva...

Por seu amor, por sua compreensão, companheirismo e seu incentivo, desculpe-me por toda a ausência nestes últimos tempos. E quero que saiba que esta minha vitória também é sua, este meu sonho sendo concretizado eu devo a você que sempre me incentivou e me proporcionou seu porto seguro.

Amo você!

Ao meu amado filho Lucas Constantino Silva, obrigada por compreender e estar sempre ao meu lado, você talvez não saiba mas muitas vezes conseguiu me dar forças extras para continuar a minha jornada, AMO MUITO VOCÊ.

Agradecimento Especial

Quero fazer um agradecimento especial à você Dra. Anete Sevciovic Grumach minha orientadora, pois agora que paro para fazer os agradecimentos vejo como se fosse um filme a desenrolar em minha frente e vejo cada momento deste trabalho e sinto esta vontade de te agradecer de uma forma diferente.

Agradeço a você Anete por me aceitar em seu grupo de trabalho, depois por me aceitar como orientanda, pela oportunidade que me deste para realizar este trabalho,

Por todos incentivos que sempre me deu, pelas palavras sábias que sempre vieram no momento exato de forma exata,

Pela confiança que em mim depositou,

Agradeço por toda a convivência que você permitiu que eu tivesse a seu lado, mostrando-me a profissional maravilhosa que é, por mostrar toda a sua capacidade como médica, pesquisadora, professora, mulher, amiga, pois foi nestes momentos que pude ver o tão grande você é como pessoa, pois vi toda a sua “grandeza” na sua “humildade,” no seu jeito de tratar as pessoas em geral, por acreditar sempre no outro, pelo seu jeito de ajudar a todos independente de classe social.

Agradeço por toda esta amizade que cresceu ao longo destes anos, agradeço pela nossa convivência e espero tê-la como companheira de trabalho, de pesquisas e como amiga por muito tempo.

Obrigado por tudo minha querida MESTRA!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Evandro Rivitti, Chefe do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas – FMUSP.

Ao Prof. Alberto José da Silva Duarte pela oportunidade de ingressar no LIM 56 para minha especialização profissional, depois como aluna de Pós – Graduação.

Ao Prof Dr Elie Fiss pela minha acolhida no Departamento de Pneumologia da Faculdade de Medicina do ABC.

Ao Prof Dr Luiz Henrique Paschoal, pela confiança depositada em mim.

A Dra. Raquel Bellinati, meu muito obrigada, por me ensinar a gostar de Fagocitose e por tudo que me ensinaste no início do meu aprendizado.

À Dra. Maria Notomi Sato pelo seu companheirismo, compreensão, discussões de experimentos que ajudaram muito na formação de minha bagagem profissional ao longo destes anos.

Á Profa. Dra Mirian Nacagami Sotto por toda sua ajuda, pela sua compreensão, pelo seu profissionalismo, pela sua forma justa de avaliação.

À Dra. Valéria Aoki por seus comentários de grande valia em minha qualificação e pela suas palavras de incentivo.

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto pela suas colocações em meu trabalho, pelos seus questionamentos que me fez ser mais auto-crítica.

A Dra.Cristina Maria Kokron pelos elogios, críticas e dicas ao meu trabalho.

À Dra Shirley Komninakis por toda palavra de incentivo, correção de trabalho, conversas de escada quando precisávamos de um fôlego, pelas risadas, pela amizade verdadeira que ficou, obrigada minha amiga!

Ao Prof. Dr Carlos D'aparecida Machado Filho pela sua compreensão, seu respeito, seu incentivo, meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Milton Borrelli pela ajuda, pelas conversas de experiências de vida, dando exemplos maravilhosos a serem seguidos.

Aos meus queridos amigos e companheiros de grupo Alexandre Pires Correia e Rafael Arnold, Natasha Ferraroni, Viviana Galimberti, Simone Castagnaro, "AMIGOS" obrigado por tudo, pelas risadas, pelas brigas, pelas lágrimas, pela amizade que se formou que a cada dia se solidifica mais.

As minhas "Queridas e eternas amigas" Noemia Orii e Rosangela Araújo, pela amizade verdadeira que se formou, pelos treinamentos de Citometria e técnicas laboratoriais, serei eternamente grata à vocês.

Às minhas amigas Camila Cécere, Paula Rigato, Soraya Ogussuku, pelo companheirismo, amizade, auxílio na bancada.

Ao Nelson (Francinelson), Cyro, Jefferson, Cleiton, Bruno, Fábio, pelas boas conversas de final de tarde, auxílio nas dificuldades com os programas do computador.

A Dona Eli Maria, pessoa tão importante a todos os pós graduandos do Departamento de Dermatologia, obrigada pelos puxões de orelha quando era necessário, por toda ajuda que me deu nestes anos de convívio, meu muito obrigada.

A todos os amigos de outros "LIMS" que fiz nestes doze anos e que muito me ajudaram no decorrer dos anos.

Ao meu amigo Luis Abrahão, obrigada por tudo, pois você sempre esteve pronto a me ajudar no que fosse necessário.

A Edna (Secretária) pela sua amizade, auxílio, enfim, toda ajuda na parte burocrática do projeto.

À Silvinha e Adriana da limpeza, o meu muito obrigado, pois sem vocês nada funciona.

A todos os integrantes do LIM 56, técnicos, secretárias, informática. almoxarifado, que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

A amiga Itatiana da Reprodução Humana – FMABC por toda amizade e companheirismo.

A minha amiga Edna Oliveira pela força, admiração e amizade.

A minha amiga Ana Lúcia (irmã de alma) obrigada por sempre estar do meu lado, me escutando e me dando o seu ombro.

A minha amiga Priscila F. Araújo (irmã de alma), obrigada por fazer parte de toda esta jornada e por estar sempre ao meu lado nesta trajetória tão importante. Nossa amizade superou muitas coisas..

A todos os pacientes do Ambulatório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo e da Faculdade de Medicina do ABC, que aceitaram voluntariamente participar deste trabalho, “Meu muito obrigado”.

Aos profissionais da comissão de ética da Faculdade de Medicina do ABC

À Faculdade de Medicina do ABC por permitir a realização de várias técnicas no laboratório de Imunologia.

A CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

Esta tese esta de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentações e dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Abreviaturas

Ac	-	Anticorpo
CH 50	-	Complemento hemolítico 50%
CFU	-	"Colony forming units"
DHR	-	Dihidrorodamina
DCFH-DA	-	2'7' diacetato de diclorofluoresceína
DGC	-	Doença granulomatosa crônica
ERO	-	Espécies reativas do oxigênio
FITC	-	Isotiocianato fluorescente
FcγRIII	-	Receptor
FcγRI	-	Receptor
FC	-	Região C de imunoglobulina com especialização funcional
GM-CSF	-	Fator estimulador de colônia – granulócito macrófago
GPI	-	Glicosilfosfatidilinositol
H ₂ O ₂	-	Peróxido de Hidrogênio
IDP	-	Imunodeficiências Primárias
IFNγ	-	Interferon gama
IGM	-	Imunoglobulina M
IgG1	-	.Sub-classe de imunoglobulina
IgG3	-	Sub-classe de imunoglobulina
ICAM-1	-	Intercellular cell adhesion molecule-1
LPS	-	Lipopolissacarideo
MPO	-	Enzima mieloperoxidase

NADPH-oxidase	-	Complexo enzimático responsável pela produção de ERO
NBT	-	Nitro Blue tetrazolium
NR	-	Não referido
NK	-	Natural Killer
PAMPS	-	Pathogen-associated molecular patterns
PMNS	-	Células polimorfonucleares
PE	-	Phicoeritrina
PI	-	Iodeto de Propídio
PK	-	Piruvato quinase
PNSG	-	Poli-N-succinil- β -1,6- glucosamina
PMA	-	Forbol Miristato Acetato
<i>S. aureus</i>	-	<i>Stafilococcus aureus</i>
SDF	-	Suspeita de distúrbio de fagócitos
TNF	-	Fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	-	Micrograma
μM	-	Micromolar
mL	-	Mililitro
ng	-	nanograma
rpm	-	rotações por minuto
$^{\circ}\text{C}$	-	Graus Celsius
μ	-	micra

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características gerais da Imunidade Inata e Adaptativa.....	6
Tabela 2 -	Defeitos Congênitos de Fagócitos	20
Tabela 3 -	Funções fagocitárias, técnicas de avaliação e deficiências diagnosticadas com esta metodologia.	22
Tabela 4 -	Comparação entre técnicas de avaliação do metabolismo oxidativo: nitrotetrazolio azul (NBT) e dihidrorodamina (DHR).	25
Tabela 5 -	Estudos publicados de avaliação da função fagocitária em indivíduos adultos saudáveis.....	28
Tabela 6 -	Estudos realizados de avaliação da função fagocitária em várias doenças.	32
Tabela 7 -	Pacientes incluídos para a realização das técnicas de avaliação fagocitária.	36
Tabela 8 -	Dados clínicos dos pacientes com Doença Granulomatosa Crônica.	37
Tabela 9 -	Dados clínicos de Pacientes com Candidíase Mucocutânea Crônica.....	38
Tabela 10 -	Dados clínicos de pacientes com Candidíase persistente (CP).	39
Tabela 11 -	Dados clínicos de pacientes com manifestações sugestivas de distúrbios de fagócitos.....	40
Tabela 12 -	Preparação dos tubos para fagocitose e morte intracelular de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> com ou sem opsonização.....	55
Tabela 13 -	Preparação dos tubos para fagocitose e morte intracelular com ou sem opsonização de fungos.....	58
Tabela 14 -	Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em amostras de indivíduos saudáveis no tempo 0 e após 24 horas da coleta de sangue.	64
Tabela 15 -	Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em amostras de pacientes encaminhados de outros serviços (n=7) no tempo 0 e após 24 horas da coleta de sangue.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismos de defesa da pele.....	9
Figura 2 -	Teste do nitrotetrazolio azul (NBT) em indivíduo sadio.	23
Figura 3 -	Dihidrorodamina (DHR) estimulado com Forbol miristato acetato (PMA) em indivíduo sadio.	24
Figura 4 -	Metabolismo oxidativo, métodos de avaliação e de identificação dos tipos de DGC.	31
Figura 5 -	Lesões apresentadas por mãe de paciente com Doença Granulomatosa Crônica.....	37
Figura 6 -	Lesões de pele infectadas em Paciente com Síndrome de Hiper IgE.....	41
Figura 7 -	Paciente com Síndrome de Netherton	41
Figura 8 -	Teste do NBT em indivíduo sadio e indivíduo portador de DGC.....	43
Figura 9 -	Representação esquemática dos reagentes no teste da Dihidrorodamina para avaliar a explosão oxidativa	45
Figura 10 -	Teste da Dihidrorodamina em indivíduo portador de DGC.....	45
Figura 11 -	Câmara de Boyden utilizada para o ensaio de quimiotaxia	47
Figura 12 -	Imagem microscópica das células após quimiotaxia em membrana de éster celulose em 3 campos.....	48
Figura 13 -	Representação esquemática dos reagentes no experimento de fagocitose e aderência de <i>S.aureus</i> (BE=Brometo de etídio).....	50
Figura 14 -	Representação esquemática dos reagentes no experimento de Fagocitose e aderência de <i>Candida albicans</i>	53
Figura 15 -	Teste da Dihidrorodamina (DHR)(n=101) e do Azul de Nitrotetrazolio (NBT)(n=50) em indivíduos sadios. (Anexo).....	63
Figura 16 -	Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em pacientes com Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC) e Candidíase Persistente (CP) em comparação com o grupo controle.	65
Figura 17 -	Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC), portadores de DGC e com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) em comparação com o grupo controle.....	66
Figura 18 -	Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em pacientes com Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC), Candidíase Persistente (CP), Doença Granulomatosa Crônica (DGC), portadores de DGC e	

	com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) em comparação com o grupo controle, expressos em Média de índice de Fluorescência (mif).	67
Figura 19 -	Quimiotaxia de pacientes com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) (n=5) em comparação com o grupo controle (μ).	68
Figura 20 -	Quimiotaxia de pacientes com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) (n=5) em comparação com o grupo controle (μ).	69
Figura 21 -	Percentual de Fagocitose de Bactérias inativadas sem opsonização, opsonizadas com soro AB e opsonizadas com soro autólogo em controle, pacientes com CMC e CP.	70
Figura 22 -	Média de Índice de Fluorescência da Fagocitose de Bactérias inativadas sem opsonização, opsonizadas com soro AB e opsonizadas com soro autólogo.....	71
Figura 23 -	Percentual de Aderência de Bactérias inativadas sem opsonização, opsonizadas com soro AB e opsonizadas com soro autólogo em controles e pacientes com CMC e CP.	72
Figura 24 -	Fagocitose de fungos <i>Candida albicans</i> inativados sem opsonização, com opsonização com soro AB e opsonizadas com soro autólogo.....	73
Figura 25 -	Média da intensidade de Fluorescência da Fagocitose de fungos <i>Candida albicans</i> inativados sem opsonização, opsonizadas com soro AB e opsonizadas com soro autólogo.....	74
Figura 26 -	Aderência de fungos <i>Candida albicans</i> inativados sem opsonização, opsonizados com soro AB e opsonizados com soro autólogo, em percentual.	75
Figura 27 -	Fagocitose de bactérias sem opsonização do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.....	77
Figura 28 -	Morte Intracelular de bactérias sem opsonizar do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.....	78
Figura 29 -	Fagocitose de bactérias opsonizadas com soro AB do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.....	79
Figura 30 -	Morte Intracelular de bactérias opsonizadas com soro AB do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.....	80
Figura 31 -	Fagocitose de bactérias opsonizadas com soro autólogo do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.....	81
Figura 32 -	Morte Intracelular de bactérias opsonizadas com soro autólogo do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.....	82
Figura 33 -	Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de bactérias <i>S.aureus</i> sem opsonização nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	83

Figura 34 -	Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de bactérias <i>S.aureus</i> opsonizada com soro AB nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	84
Figura 35 -	Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de bactérias <i>S.aureus</i> opsonizadas com soro autólogo nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC..	85
Figura 36 -	Fagocitose de fungos sem opsonizar nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	87
Figura 37 -	Morte intracelular de Fungos sem opsonizar nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	88
Figura 38 -	Fagocitose de fungos opsonizados com soro AB nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	89
Figura 39 -	Morte intracelular de Fungos opsonizados com soro AB nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	90
Figura 40 -	Fagocitose da morte intracelular de fungos opsonizados com soro autólogo nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	91
Figura 41 -	Morte intracelular de Fungos opsonizados com soro autólogo nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	92
Figura 42 -	Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de <i>Candida albicans</i> sem opsonização. nos grupos controle, CMC, CP, SDF.....	93
Figura 43 -	Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de <i>cândida albicans</i> opsonizada com soro AB nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.	94
Figura 44 -	Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de <i>cândida albicans</i> opsonizados com soro autólogo nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC..	95
Figura 45 -	Valores de CH50 realizado em placa e em tubo em amostras de doadores de sangue.....	96
Figura 46 -	Valores de CH50 realizado em placa nas amostras de um grupo controle (C), pacientes com <i>Candidíase persistente</i> (CP) e com <i>Candidíase Mucocutânea crônica</i> (CMC).Todos	97
Figura 47 -	Valores de AP50 realizado em placa e em tubo em amostras de doadores de sangue.....	98

SUMÁRIO

Abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.A	Considerações gerais	1
1.B	O Sistema imune	5
1.C	Distúrbios imunológicos com envolvimento de fagócitos	12
1.C.a	Doença Granulomatosa Crônica	12
1.C.b	Candidíase Mucocutânea Crônica	16
1.C.c	Outras Imunodeficiências de fagócitos	19
1.D	Avaliação da Função Fagocitária	20
2	OBJETIVOS	34
3	CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....	35
3.A	Casuística	35
3.B	Métodos	42
3.B.a	Teste de Redução do NBT (Nitroblue tetrazolium)	42
3.B.b	Oxidação da Dihidrorodamina (DHR) por Citometria de Fluxo	43
3.B.c	Avaliação da Quimiotaxia	46
3.B.d	Avaliação da Fagocitose e aderência de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> . .	48
3.B.e	Avaliação da Fagocitose e aderência de Fungo <i>Candida albicans</i>	51
3.B.f	Avaliação da morte Intracelular de bacterias <i>Staphylococcus aureus</i>	54
3.B.g	Avaliação da morte Intracelular de Fungos <i>Candida albicans</i>	57
3.B.h	Avaliação de CH 50 E AP50	59
3.C	Análise Estatística	61
4	RESULTADOS	63
4.A	Avaliação do burst oxidativo: Testes do NBT e DHR	63
4.B	Avaliação da capacidade quimiotática	67
4.C	Fagocitose e Aderência de bactérias inativadas	69

4.D	Fagocitose e Aderência de fungos <i>Candida</i> inativados	72
4.E	Fagocitose e Morte Intracelular de bactérias <i>S. aureus</i>	76
4.F	Fagocitose e Morte Intracelular de fungos <i>Candida albicans</i>	86
4.G	Ensaio hemolítico para avaliação da integridade da via clássica (CH50)	96
	4.G.a Ensaio hemolítico para avaliação da integridade da via alternativa (AP50).	98
5	DISCUSSÃO	99
6	CONCLUSÃO	110
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXOS		123
	Anexo I	123
	Anexo II	124
	Anexo III	125
	Anexo IV	129
	Anexo V	132
	Anexo VI	135
	Anexo VII	137
	Anexo VIII	139
	Anexo IX	141
	Anexo X	142
	Anexo XI	143
	Anexo XII	144
	Anexo XIII	145
	Anexo XIV	146
	Anexo XV	148
	Anexo XVI	149
	Anexo XVII	151
	Anexo XVIII	153

RESUMO

Constantino-Silva, RN. Avaliação funcional de fagócitos em imunodeficiências com manifestações cutâneas. (Tese). São Paulo: Departamento de Dermatologia – (LIM-56) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010.

A pele e as mucosas constituem as primeiras barreiras na defesa contra infecções e os macrófagos são componentes essenciais do sistema imune inato, importante neste aspecto. O envolvimento destas células pode ser verificado em grande percentual das imunodeficiências primárias. Desta forma, a avaliação da função fagocitária é de extrema relevância para o reconhecimento dos distúrbios imunológicos que acometem a pele. O objetivo do presente estudo foi avaliar a metodologia laboratorial para a detecção de defeitos funcionais dos fagócitos. Para isto foram estabelecidos os seguintes testes laboratoriais: Nitro Blue Tetrazolium (NBT), Dihidrorodamina (DHR), quimiotaxia, fagocitose e a aderência de *S. aureus* e *C. albicans* por citometria de fluxo (CF), além de morte intracelular de *S. aureus* e *C. albicans* (CF). Para verificar a integridade do sistema complemento realizou-se ensaios hemolíticos para as vias clássica e alternativa (CH50 e AP50). A metodologia proposta foi aplicada em indivíduos normais para a padronização dos testes.

O “burst” oxidativo avaliado pelo teste da dihidrorodamina (DHR) foi aplicado em 101 indivíduos saudáveis e em paralelo, 50 indivíduos sadios para o teste do NBT.

Os mesmos testes foram realizados em pacientes com Candidíase mucocutânea crônica (CMC) (n=9), Candidíase persistente (n=5), Suspeita de distúrbios de fagócitos (SDF) (n=14), Doença Granulomatosa Crônica (DGC)(n= 7) e portadores de DGC (n=5).

A quimiotaxia foi padronizada em 34 controles para neutrófilos estimulados com Lipopolissacarídeo de *E. Coli* (LPS) e 5 com fungo *Candida albicans*. A técnica de fagocitose e aderência de patógenos foi padronizada com os mesmos estímulos (n=7 para fungos/n=5 para bactéria). Após a padronização, o ensaio foi aplicado em pacientes com candidíase persistente (n=5 para bactéria e n=5 para fungo) e em pacientes com CMC (n= 3 para bactéria e n=4 para fungo). Os ensaios de fagocitose e morte intracelular (capacidade bactericida e fungicida) foram padronizados em 18 indivíduos sadios para bactérias e os ensaios de morte intracelular para *S. aureus* foi aplicado em pacientes com CMC (n=5), com CP (n=6), com SDF (n =9) e com DGC (n=2), para os ensaios de fagocitose com morte intracelular para fungos foram utilizados 22 indivíduos saudáveis e após a

padronização do ensaio foram aplicados em pacientes com CMC (n=8), pacientes com CP (n=7), pacientes com DGC (n=2) e indivíduos com SDF (n=13)

O ensaio de DHR foi padronizado e estabelecido em $\geq 80\%$ de intensidade de fluorescência para células estimuladas com PMA e $\leq 15\%$ de intensidade de fluorescência para células sem estímulo. Nos resultados do DHR encontrou-se diferença significativa no grupo de DGC (n=7)(P= 0,0001), no grupo de portadores (n=5)(P=0,0005) e no grupo de SDF (n=14)(P= 0,0053). O ensaio do DHR foi repetido após 24 horas da coleta (n=7), não se verificando alteração da resposta. A quimiotaxia mostrou diferença significativa entre C (n=4) vs SDF (n=3)(P=0,0001) e pacientes com CMC apresentaram redução da capacidade quimiotática para bactérias (n=3) e fungos (n=4) com soro autólogo (P= 0,0246 e P=0,0109, respectivamente).

Na fagocitose e aderência de bactérias inativadas, os grupos de CMC, CP e SDF não mostraram diferenças significativas com bactérias não opsonizadas ou opsonizadas com soro AB e apresentaram menor índice de fagocitose (C x CMC)(P=0,0357) quando foram opsonizadas com soro autólogo. Na fagocitose e aderência de fungos inativados, controles e grupos de pacientes apresentaram resposta semelhante com fagocitose preservada. Os ensaios de morte intracelular para bactérias não opsonizadas houve menor expressão de fagocitose no grupo de C x SDF (P=0,0044). Na capacidade bactericida verificou-se diferença significativa entre os grupos CxCMC (P=0,0403). A opsonização das bactérias com soro AB foi significativamente diferente entre os grupos CxCP (P=0,0129) e CxSDF (P=0,0048) e com capacidade bactericida diferente entre grupos CxCP (P=0,0258) e CxSDF (P=0,0205). Na avaliação da fagocitose de bactérias opsonizadas com soro autólogo foi verificada diferença significativa entre os grupos CxCP (P=0,0013) e CxSDF (P=0,0048). Não houve diferença na capacidade bactericida dos grupos de pacientes com o controle. Os ensaios de fagocitose e morte intracelular para fungos sem opsonização não mostrou diferença estatisticamente significativa. A morte intracelular mostrou-se diferente para o grupo CxCMC (P=0,0155) e quando opsonizado com soro AB houve diferença CxCP (P=0,0369). A fagocitose com opsonização por soro autólogo significativa no grupo CxSDF (P=0,0001) e um paciente de CMC com sua fagocitose comprometida quando comparado com o controle do dia. A morte intracelular foi diferente nos grupos CxCMC (P=0,0018) e CxCP (p=0,0203). Não houve diferença estatisticamente significativa à avaliação do complemento.

O ensaio do DHR mostrou ser sensível e preciso para o diagnóstico de DGC e portadores de DGC, porém pode detectar outras alterações de fagócitos. O ensaio de aderência e fagocitose mostraram-se variáveis dificultando a padronização de valores de normalidade e exclusão de defeitos. Ensaio de fagocitose com morte intracelular mostraram-se como a melhor forma de detectar distúrbios de fagócitos além do diagnóstico de DGC. A aplicação de controles do dia mostrou-se necessária e importante para a detecção de defeitos funcionais. O presente trabalho mostrou que a avaliação de

distúrbios de fagócitos por morte intracelular por citometria de fluxo pode ser aplicado em outras situações clínicas com comprometimento imunológico.

Descritores: 1.Fagócitos 2.Candidíase mucocutânea crônica 3.Doença granulomatosa crônica 4.Manifestações cutâneas 5.Fagocitose 6.Portadores de doença granulomatosa crônica 7.Atividade bactericida de fagócitos 8.Atividade fungicida de fagócitos

Summary

Constantino-Silva, RN. Functional phagocyte evaluation in immunodeficiencies with cutaneous manifestations. (Tese). São Paulo: Department of Dermatology – (LIM-56) School of Medicine, São Paulo University, 2010.

Skin and mucosa are part of the first barriers in the defense against infections, and the macrophages are essential components of the innate immune system, important when related to this aspect. The involvement of these cells can be seen in a large percentage of the primary immunodeficiencies. Therefore, the assessment of the phagocitary function is extremely important for the recognition of immunological disorders which affect the skin. The present study focus on the evaluation of the laboratorial methodology for the detection of functional defects of phagocytes. For this the following laboratorial tests were established: *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT), chemotaxis, phagocytosis and adherence of *S. aureus* and *C. albicans* through flow cytometry (FC), besides the intracellular death of *S. aureus* and *C. albicans* (FC). To assess the integrity of the complement system hemolytic assays were performed for the classic and alternative pathways (CH50 and AP50). The proposed methodology was applied to normal individuals for the standardization of the assays.

The oxidative burst evaluated through the dihydrorodamine essay (DHR) was applied to 101 healthy individuals and in parallel, 50 healthy individuals for the NBT assay.

The same assays were performed on patients with Chronic mucocutaneous candidiasis (CMC)(n=9), persistent candidiasis (n=5), Phagocytes disorders suspicious (PDS) (n=14), Chronic granulomatous disease (CGD)(n=7) and CGD carriers (n=5).

Chemotaxis was standardized using 34 controls for neutrophils stimulated by lipopolisacharydes from *e. coli* (LPS) and 5 by *C. albicans*. Phagocytosis and adherence of pathogens were standardized using the same stimuli (n=7 for fungi and n=5 for bacteria). Following the standardization, the assay was applied to patients with persistent candidiasis (n=5 for fungi and n=5 for bacteria) and on patients with CMC (n=4 for fungi and n=3 for bacteria). Phagocytosis and intracellular death assays (bactericidal and fungicidal capacity) were standardized using 18 healthy individuals for bacteria and the intracellular death assays for *S. aureus* were applied on patients suffering from CMC (n=5), from PC (n=6), from PDS (n=9) and from CGD (n=2), for the phagocytosis with fungi intracellular death assays 22 healthy individuals

were used, and following the standardization the assay was applied to patients suffering from CMC (n=8), from PC (n=7), from CGD (n=2) and PDS individuals (n=13).

The DHR assay was standardized and established according to fluorescence intensity $\geq 80\%$ for cells stimulated by PMA and fluorescence intensity $\leq 15\%$ for cells without stimuli. In the DHR results a significant difference in the CGD group (n=7)(P= 0,0001), in the carriers group (n=5)(P=0,0005) and in the PDS group (n=14)(P= 0,0053) was found.

The DHR assay was performed once again 24 hours after the sample collection (n=7) and no changes in the response were seen. Chemotaxis showed a significant difference between C (n=4) vs PDS (n=3)(P=0,0001) and patients suffering from CMC showed decreased ability in the chemotaxis of bacteria (n=3) and fungi (n=4) with autologous serum (P= 0,0246 e P=0,0109, respectively).

In the phagocytosis and adherence of inactivated bacteria, the CMC, PC and PDS groups showed no significant differences with non-opsonized bacteria or opsonized with AB serum and presented a lower phagocytosis level (C x CMC)(P=0,0357) when they were opsonized by autologous serum. In the phagocytosis and adherence of inactivated fungi, controls and patient groups presented a similar response with preserved phagocytosis. In the intracellular death assays for non-opsonized bacteria there was a lower phagocytosis expression in the C x SDF group (P=0,0044). In the bactericidal ability a significant difference between the groups C x CMC was seen (P=0,0403). The opsonization of bacteria with AB serum showed a significant difference among the groups C x CP (P=0,0129) and C x SDF (P=0,0048) and with different bactericidal ability among the groups C x CP (P=0,0258) and C x SDF (P=0,0205). In the evaluation of the phagocytosis of bacteria opsonized by autologous serum a significant difference among the groups C x CP (P=0,0013) and C x SDF (P=0,0048) was seen. There was no difference between the bactericidal ability of the patients group and control group. The phagocytosis and intracellular assays for fungi without opsonization presented no significant statistical difference. Intracellular death was different for the C x CMC group (P=0,0155) and when opsonized by AB serum difference was shown C x CP (P=0,0369). The phagocytosis with opsonization by autologous serum presented significant difference in the C x SDF group (P=0,0001) and in a CMC patient with compromised phagocytosis when compared with the daily control. Intracellular death was different in the C x CMC (P=0,0018) and C x CP (p=0,0203) groups. There was no significant statistical difference according to the complement evaluation.

The DHR assay was seen as very sensitive and precise for the diagnosis of CGD, however it can detect other phagocyte alterations. The phagocytosis and adherence assay varied a lot making the standardization of normal values and defects exclusion very difficult. Phagocytosis with intracellular death assays showed the best performance to detect phagocytes disorders besides CGD diagnosis. The use of daily controls was seen as very

necessary and important to detect functional disorders. This study demonstrated that phagocytes disorder evaluation through intracellular death using flow cytometry can be applied to other clinical situations which are immunologically compromised.

Descriptors: 1.Phagocyte, 2.Chronic Mucocutaneous Candidiasis, 3.Chronic Granulomatous, 4. cutaneous manifestations, 5. Phagocytosis, 6. Chronic Granulomatous carries, 7.Bactericidal Phagocytes Activity, 8.Fungicidal Phagocytes Activity.

1 INTRODUÇÃO

1.A Considerações gerais

A pele é o maior órgão do corpo humano, cobrindo uma área de mais de 2 m² e correspondendo a aproximadamente 16% do peso corpóreo total (Johnstone et al, 2005). É um órgão muito vascularizado com espessura variando de 0,5 mm na membrana timpânica a 4 mm nas palmas das mãos e solas dos pés. As células epiteliais estão unidas por junções firmes, as quais formam uma barreira contra o ambiente externo. O epitélio abrange a pele e a superfície das estruturas tubulares: os tratos respiratório, gastrointestinal e urinário.

A pele desempenha múltiplas funções: protege da invasão de microrganismos, controla a perda de calor, água e eletrólitos, impede os efeitos prejudiciais de radiações, atua na formação da vitamina D, portanto, tem um papel relevante na homeostasia do corpo humano (Johnstone et al, 2005). Com relação à proteção contra agentes infecciosos, a pele e as membranas mucosas representam os locais mais comuns de entrada e, de onde podem disseminar e causar doença em outros órgãos (Orrego et al, 1995). Além dos mecanismos imunológicos, uma barreira física à infecção se forma; pois, substâncias químicas que são microbicidas ou que inibem o crescimento microbiano são secretadas.

A importância da barreira da pele torna-se óbvia quando é quebrada, tal como em ferimentos, queimaduras e perda da integridade do epitélio interno do corpo, facilitando a infecção, principal causa de morbimortalidade. Na ausência de solução de continuidade, os patógenos normalmente atravessam as barreiras epiteliais pela ligação com moléculas na superfície epitelial ou aderindo e colonizando as superfícies. Esta adesão específica permite que o patógeno infecte a célula epitelial, danificando o epitélio, ultrapassando esta barreira, facilitando a colonização por patógenos. A seguir, o microrganismo replica-se nos tecidos do hospedeiro, ocorrendo, na maioria dos casos, imediatamente o reconhecimento pelos fagócitos mononucleares ou macrófagos teciduais.

A maioria das imunodeficiências primárias (IDP) apresenta-se com manifestações cutâneas e o médico deve estar atento, pois, pode ser um importante alerta para o diagnóstico precoce. De acordo com Berron-Ruiz et al. (2000), do Instituto Nacional de Pediatria da Cidade do México, além de enfatizarem a colaboração entre os Departamentos de Imunologia e Dermatologia, também ressaltam o fato de uma grande proporção de pacientes com IDP apresentarem alterações cutâneas, fazendo com que um exame dermatológico completo seja obrigatório (Berron-Ruiz et al., 2000). Esses autores avaliaram 382.283 pacientes pediátricos atendidos em um período de 26 anos e identificaram 130 pacientes com IDP (0,0003%) o que equivale a uma frequência de 1:3000 pacientes pediátricos e 1 em cada 323 pacientes dermatológicos pediátricos. Com relação ao setor da resposta imune afetado, os distúrbios de fagócitos foram diagnosticados em 28,5%,

deficiência humoral em 21%, defeitos celulares e imunodeficiências combinadas em 13,8%, imunodeficiências associadas com defeitos graves em 34,6% e defeitos de complemento em 2%. Ainda, 90 dos pacientes com imunodeficiências (69%) apresentavam pelo menos duas alterações cutâneas; processos infecciosos acometeram a pele em 80; dermatite (eczema) em 38 e outras alterações cutâneas em 57; todas estas alterações cutâneas precederam e sugeriram a investigação imunológica. Dentre os sintomas dermatológicos, os mais frequentes foram abscessos com infecções bacterianas, infecções por *Cândida* e dermatite atópica (Berron-Ruiz et al., 2000).

Pacientes pediátricos com dificuldade em ganhar peso, manifestações sistêmicas crônicas refratárias em outros membros da família, infecções cutâneas de repetição não responsivas a terapia adequada, formas atípicas de eczema ou características incomuns tais como telangiectasias, eritrodermia ou cabelos prateados também sugerem a suspeita de IDP.

O Ambulatório de Imunodeficiências Primárias desenvolvido no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (ADEE-3003) avaliou 892 pacientes em um período de 8 anos, confirmando-se IDP em 200 (22,4%) e metade dos casos diagnosticados apresentavam manifestações cutâneas. Os diagnósticos com manifestações dermatológicas incluíram: Candidíase Mucocutânea Crônica, Imunodeficiência Combinada, Doença Granulomatosa Crônica, Deficiências

de G6PD, de Adesão Leucocitária e de Complemento, Síndromes de Netherton e de Chediak-Higashi e Angioedema Hereditário (dados não publicados).

Dentre as manifestações clínicas que se associam a distúrbios imunológicos, foram agrupados os seguintes sinais:

1. Infecções bacterianas graves
2. Infecções fúngicas mucocutâneas extensas/recorrentes
3. Verrugas extensas ou outras infecções virais
4. BCGitis ou infecções por outras micobactérias pouco virulentas
5. Dermatite semelhante a alérgica com infecção ou lesões hemorrágicas
6. Telangectasias com ataxia e/ou outras anormalidades neurológicas
7. Albinismo oculocutâneo parcial com cabelo prateado
8. Pele e anexos hipoplásicos / displásicos ou cicatrização pobre com escaras
9. Gengivite e periodontite grave e perda precoce dos dentes permanentes
10. Displasia ectodérmica hipohidrótica

1.B O Sistema imune

O sistema imunológico é de grande eficiência no combate a microorganismos invasores. Sua principal função é reconhecer o próprio do não próprio, habilidade necessária para proteger o organismo contra invasores patogênicos e/ou para eliminar células modificadas. A resposta imune é responsável também pela retirada de células mortas, renovação de determinadas estruturas, rejeição de enxertos, e memória imunológica. O sistema imune é “dividido” em sistema imune inato e sistema imune adaptativo.

O sistema imune inato é nossa primeira linha de defesa contra organismos invasores, inclui mecanismos moleculares associados a patógenos (PAMPS) e componentes celulares (fagócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, *natural Killer* (NK), dendríticas) preparados para prevenir ou eliminar os agentes invasores. Este sistema previne ou elimina a infecção em poucas horas e não desenvolve memória imunológica. Além disso, o sistema imune inato também tem aspectos anatômicos que funcionam como barreira à infecção.

O sistema imune adaptativo, por sua vez, age como uma segunda linha de defesa e também protege contra a re-exposição ao mesmo patógeno. A resposta é tardia, estabelece-se a partir de 96 horas com o transporte do antígeno para os órgãos linfóides, reconhecimento deste antígeno pelas células T e B virgens, expansão clonal e diferenciação das células efetoras, resultando na remoção do agente infeccioso. Componentes

celulares e humorais compõem ambos os sistemas e, desta forma, executam suas funções de proteção.

Embora esses dois ramos do sistema imune tenham funções distintas, há conexão entre eles (isto é, componentes do sistema imune inato influenciam o sistema imune adaptativo e vice-versa) (Janeway 2007, Abbas 2010) (Tabela 1).

Tabela 1 – Características gerais da Imunidade Inata e Adaptativa

Imunidade Inata	Imunidade Adaptativa
A resposta é independente de antígeno	A resposta é dependente de antígeno
A resposta é imediata e máxima	Há período de latência entre a exposição e a resposta máxima
Não específica ao antígeno	Específica ao antígeno
A exposição não resulta em memória imunológica	A exposição resulta em memória imunológica

Deve-se ressaltar que a invasão por um microrganismo não resulta necessariamente em doença, pois, o sistema imune, na maioria dos casos, será capaz de eliminar o agente infeccioso antes que esta se estabeleça. Esta situação modifica-se quando o nível de infecção é elevado, a virulência do organismo invasor é grande, ou ainda, a imunidade está comprometida. Embora a atividade do sistema imune resulte, na maioria dos casos, em efeitos benéficos, efeitos deletérios também podem ocorrer. O estabelecimento da inflamação, por exemplo, é uma resposta a um organismo invasor e pode resultar em desconforto local e danos colaterais a tecidos saudáveis como resultado dos produtos tóxicos liberados. Além disso, em algumas situações, a resposta imune pode ser dirigida a tecidos próprios resultando em doença autoimune (Kindt, 2008).

Os microrganismos, em geral, quando penetram superfícies epiteliais são reconhecidos imediatamente por moléculas e células responsáveis pela ativação da resposta imune inata.

As primeiras células de defesa do hospedeiro a aparecerem na filogenia com função de eliminar microrganismos, células mortas e resíduos orgânicos foram os fagócitos mononucleares. Com a evolução das espécies, essas células assumiram papéis adicionais no sistema imunológico como processadoras de antígenos e como fontes de citocinas, componentes do complemento e de várias enzimas (Douglas; Yoder, 1996).

O processo da fagocitose pode ser esquematizado em etapas:

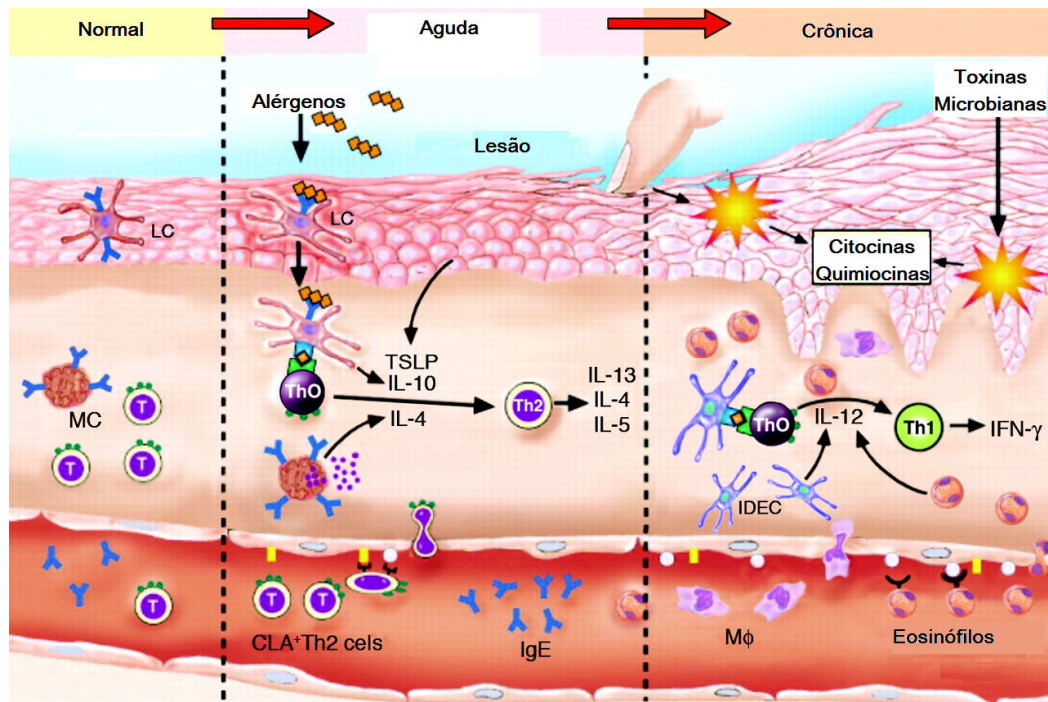
- Reconhecimento do material a ser ingerido
- Movimento em direção ao agente invasor (quimiotaxia)
- Ligação, ingestão, digestão intracelular

A primeira etapa que precede a fagocitose é a adesão da célula à parede endotelial próxima ao local da infecção, sinalizada pela presença de citocinas. Os macrófagos utilizam-se de moléculas de adesão (glicoproteínas de adesão incluindo selectinas: P-selectina, L-selectina e E-selectina, e integrinas tais como fibronectinas) e migram para o local do processo infeccioso denominando-se esta fase de quimiotaxia. As selectinas atuam no rolamento dos granulócitos, e as integrinas na adesão e extravasamento dos fagócitos.

Os neutrófilos têm uma resposta rápida aos estímulos quimiotáticos e capacidade fagocítica e de morte intracelular muito importante no sistema imunológico, sendo assim, a principal população celular na resposta inflamatória. (Abbas 2010; Lichtman; Pober, 1995). Após sua migração, os neutrófilos são ainda capazes de liberar mais mediadores, o que promove a amplificação da resposta inflamatória (Heit et al., 2002). O recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação envolve uma seqüência de eventos (ativação, rolamento, adesão e transmigração), coordenada por moléculas de adesão expressas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, envolvidas na interação leucócito-endotélio. (Figura 1)

Após a ingestão do microrganismo ocorre uma complexa série de reações bioquímicas envolvendo a utilização do complemento, certas opsoninas e a intensificação de fenômenos metabólicos intracelulares.

Figura 1 - Mecanismos de defesa da pele.



Fonte: Leung Dym et.al J Clin Invest 2004;113:651-657.

O sistema complemento juntamente com os fagócitos é considerado integrante da resposta imunológica inata, entretanto, o sistema complemento interage e modula a resposta (Dias da Silva & Kipnis, 1984; Ochs *et al.*, 1983; Erdei *et al.*, 1991). Este sistema pode opsonizar a bactéria para uma melhor fagocitose; pode recrutar e ativar várias células incluindo células polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos; pode participar na regulação de respostas de anticorpos e pode auxiliar na eliminação de complexos imunológicos e células apoptóticas. Por outro lado, o sistema complemento também tem efeitos deletérios ao hospedeiro; contribui para inflamação e danos tissulares e pode disparar a anafilaxia.

O sistema complemento é composto por mais de 30 proteínas, circulando no organismo como moléculas inativas, constituindo aproximadamente 15% da fração globulínica plasmática ou presentes na superfície celular (Frank, 1992). A maioria das proteínas do sistema complemento é sintetizada no fígado, mas muitas também são produzidas em sítios extra-hepáticos como em monócitos, macrófagos, células epiteliais do trato gastrointestinal e geniturinário e fibroblastos.

Quando ativadas, as proteínas do sistema complemento interagem de maneira altamente específica, numa seqüência de reações bioquímicas. A ativação de uma proteína, normalmente é seguida por sua quebra em dois ou mais fragmentos. O fragmento maior prossegue na cascata do complemento induzindo a lise do fragmento subsequente, enquanto o menor é liberado no plasma (Dias da Silva & Kipnis, 1984). Com a clivagem, algumas das proteínas “menores” do complemento aumentam a permeabilidade vascular, geram a migração de células para os locais invadidos ou opsonizam bactérias.

Algumas proteínas do complemento ligam-se a imunoglobulinas (IgM, IgG1 e IgG3) ou a componentes de membrana das células. As proteínas ativadas podem se ligar aos receptores de superfície do macrófago ou podem resultar em lise do microrganismo. (Unkeless, 1989). Os receptores expressos nas células que se destacam na facilitação do englobamento de microrganismos são: CR1 (para C3b, iC3b e C4b), CR3 (para iC3b) e os que se ligam à porção Fc da imunoglobulina G (IgG). Ainda,

os fagócitos polimorfonucleares e mononucleares expressam o receptor Fc γ RII ou CD32 que se liga à qualquer subclasse de IgG (com preferência pela IgG1) agregada ou ligada ao alvo fagocitário (complexada). Já na eliminação de plaquetas ou eritrócitos recobertos por IgG, *in vivo*, os macrófagos utilizam-se do receptor Fc γ RIII ou CD16 que se ligam às subclasses de IgG1 e IgG3 também complexadas, (Unkeless, 1989). Algumas bactérias não são reconhecidas pelos neutrófilos em situações de baixas concentrações de IgG, mas, os fagócitos mononucleares conseguem fagocitar estas bactérias por expressarem um receptor de alta afinidade o Fc γ RI (CD64), que reconhece IgG monomérica, (Unkeless, 1989; Curnutte, 1993). Os fagócitos também possuem receptores para porção Fc de IgA e foi demonstrado que a IgA secretora é eficiente como opsonina da *Escherichia coli enteropatogênica*, permitindo ingestão da bactéria por macrófagos do colostro humano, (Honório, 1995).

O receptor CR3 é considerado um dos receptores fagocitários mais importantes, reconhece uma variedade de substâncias endógenas e exógenas, incluindo iC3b do sistema complemento, molécula de adesão “intercellular cell adhesion molecule-1” (ICAM-1), fibrinogênio, fator X, β glucanas e açúcares de superfície de leveduras, *Escherichia coli* e *Leishmania* (Ross 1993; Todd III et Al, 1992). Quando o receptor CR3 se liga ao iC3b presente numa bactéria ou levedura, a fagocitose e degranulação são estimuladas devido ao reconhecimento simultâneo do iC3b pelo domínio I da molécula CD11b e de polissacarídeos microbianos específicos pelo sítio lectina localizado na porção carboxiterminal do domínio I. Os açúcares

específicos para CR3 incluem alguns polissacarídeos contendo manose ou N-acetil – D-glicosamina além de glicose (Thorton et al, 1996). O receptor CR3 também forma complexos transmembrânicos com glicoproteínas de superfície, ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), tais como Fcy RIII B (CD16), (“uroKinase – Type plasminogen ativador receptor” – CD87), ou o receptor para LPS (CD14), permitindo a eles a capacidade de dar sinais de ativação atingindo o citoesqueleto; (Petty e Todd II, 1996).

Com a ativação da célula ocorre um aumento do influxo de cálcio intracelular, o qual modula o sistema contrátil celular, degranulação, metabolismo oxidativo, quimiotaxia, fagocitose e função microbicida (Yang & Hill, 1991).

1.C Distúrbios imunológicos com envolvimento de fagócitos.

1.C.a Doença Granulomatosa Crônica

A Doença granulomatosa crônica (DGC) é uma condição geneticamente heterogênea, afeta aproximadamente 1 em cada 200.000 indivíduos, caracteriza-se por infecções graves bacterianas por microrganismos catalase-positivos (*Staphylococcus aureus*, enterobacteria) e fungicas (*Aspergillus*, *Candida*), e é, muitas vezes, fatal. Decorre da falha enzimática no sistema NADPH e estes defeitos resultam na incapacidade dos fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) em destruir os

microrganismos englobados, ou seja, fagocitados (Rosenzweig,Holland, 2004).

A produção de ânion superóxido ocorre em resposta à fagocitose, sendo produzida pela transferência de elétrons da NADPH a moléculas de oxigênio, em uma reação mediada pela NADPH-oxidase. O superóxido é convertido em outros radicais tóxicos, como radical hidroxil, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito. A NADPH oxidase é um complexo enzimático formado por 5 proteínas: gp91, p22, p47, p67 e p40. As proteínas de membrana, gp91 e p22 e as proteínas citoplasmáticas, p47, p67 e p40 unem-se à membrana do fagolisossoma em resposta ao estímulo inflamatório, como a fagocitose. Quando há um defeito em uma destas proteínas não ocorre a produção destes radicais e a morte das bactérias catalase-positivas, resultando na doença granulomatosa crônica. (Leusen et al, 1994)(Vowells, SJ,1995 (Segal, 1996), (Rosenzweig,Holland, 2004),

Até o momento, foram descritos quatro defeitos bioquímicos causadores da DGC, induzidos por diferentes mutações nos genes que codificam quatro proteínas, cadeia pesada beta (p91^{phox}) e cadeia leve alfa (p22^{phox}) do citocromo b558, e dois fatores citosólicos que se ligam ao citocromo, p47^{p^{phox}} e p67^{p^{phox}}. Defeitos do p91^{phox} causam a DGC ligada ao cromossomo X e perfazem 65% dos casos, enquanto que defeitos do p47^{p^{phox}}, uma das causas de DGC autossômica recessiva, são responsáveis por 25% dos casos. Defeitos do p22^{phox} e p67^{p^{phox}} também levam a DGC autossômica recessiva, cada um contribuindo com 5% dos casos (Roos &

Curnutte,1999). Descreveu-se recentemente um paciente com DGC secundária a defeito no componente rac2 (Johnston,2001).

Clinicamente, o diagnóstico de DGC deve ser sugerido em pacientes portadores de infecções supurativas crônicas ou de repetição por patógenos produtores de catalase (vide acima) e algumas bactérias gram-negativas. Outros patógenos que afligem pacientes com DGC incluem fungos como *Aspergillus*, espécies de *Salmonella*, *Nocardia*, micobactérias tuberculosas e não tuberculosas. As infecções por *Pseudomonas*, embora seja um microrganismo catalase positivo, raramente ocorrem em pacientes com DGC.

Como qualquer órgão pode ser afetado, as superfícies mucosas e cutâneas normalmente são mais suscetíveis à colonização por fungos e bactérias por constituírem barreiras naturais do organismo. Portanto, dermatite, enterite e abscessos peri-retais são formas comuns de infecção. As manifestações cutâneas incluem principalmente dermatite eczematóide ou piogênica, furunculose e abscessos (Arbiser, 1995; Berron-Ruiz et al, 2000; Condino Neto; Grumach AS, 2008). Além dos processos infecciosos, pacientes com DGC freqüentemente formam granulomas persistentes e exuberantes. As manifestações clínicas da inflamação crônica são variadas e incluem ulceração da pele, inflamação excessiva em feridas cirúrgicas com drenagem e deiscência, doenças auto-imunes lembrando lúpus eritematoso sistêmico, lúpus discóide, pneumonite e doença inflamatória intestinal lembrando doença de Crohn. O envolvimento

granulomatoso de vísceras ocas pode resultar em obstrução gastrointestinal e de trato genitourinário.

Os fenótipos mais comuns de portadores de DGC ligada ao X são as lesões cutâneas lembrando lupus discóide clinicamente e histologicamente, e a estomatite aftosa de repetição. Tais lesões cutâneas foram observadas em pacientes com DGC ligada ao X e autossômica recessiva. Apesar da maioria dos portadores com aproximadamente 10% dos fagócitos normais apresentarem defesa normal, em situações raras uma grande proporção dos granulócitos circulantes apresenta defeitos funcionais e os portadores podem desenvolver manifestações clínicas sugestivas de DGC com infecções de repetição.

O diagnóstico é estabelecido por uma história clínica compatível e demonstração de um defeito no “burst” respiratório.

Vários estudos retrospectivos mostraram que a profilaxia com sulfametoxazol-trimetoprim reduz o índice de infecções graves nos pacientes com DGC. Em um estudo prospectivo europeu, a profilaxia com itraconazol reduziu as infecções por *Aspergillus* e a droga foi bem tolerada. O interferon gama é um fator ativador de macrófago e aumenta a geração de H₂O₂ em monócitos circulantes. Um estudo multicêntrico realizado em 1991, mostrou uma redução em cerca de 70% na ocorrência de infecções em pacientes com DGC recebendo interferon gama. O transplante de medula óssea pode ser indicado em casos com infecções graves apesar da antibioticoterapia e da profilaxia com interferon. Recentemente, a terapia

gênica foi realizada em cinco pacientes com deficiência de p47^{phox} com boa resposta.

1.C.b Candidíase Mucocutânea Crônica

A candidíase mucocutânea crônica (CMC) é uma doença rara, de baixa incidência, com relatos isolados em literatura.classificada como uma imunodeficiência primária complexa que se apresenta como infecção fúngica superficial persistente ou recorrente, refratária aos tratamentos antifúngicos usuais (Kanarek; 1998). São micoses superficiais (cutâneo-mucosas) e ou sistêmicas, essencialmente oportunistas, causados por leveduras do gênero *Candida*, (Lacaz, 1998).

Na candidíase mucocutânea crônica os locais mais afetados são as mucosas-faríngea e oral, trato gastrintestinal e vagina. As manifestações clínicas surgem, freqüentemente, durante a infância, antes dos três anos de idade e, quanto mais precoce o surgimento das infecções por *Candida*, maior é a gravidade da doença; (Holt et.al.;1972; Liesegang et.al.; 1983; Durandean et.al.; 1986; Kirkpatrick, 1994).

Vários trabalhos mostram que manifestações clínicas descritas em associação a Candidíase mucocutânea crônica são amplas, sugerindo o acometimento de vários órgãos. Segundo Polizzi et.al. (1996) 90% dos pacientes com candidíase mucocutânea crônica apresentam infecções bacterianas, virais ou por outros fungos; Herrod(1990) descreve que 50% dos pacientes com CMC apresentam endocrinopatias.

A reação inflamatória aguda é um importante mecanismo de defesa contra a infecção fúngica, pois ocorre a migração dos fagócitos para o sítio onde se encontra o patógeno (quimiotaxia), possibilitando a fagocitose, morte e digestão do fungo pelos neutrófilos e monócitos/macrófagos (Djawari, et. al., 1978; Franzke, et.al., 1993).

O interferon gama (IFN γ), fator de necrose tumoral (TNF), e a opsonização pelo sistema complemento facilitam a fagocitose, (Marodi et. al., 1993; Bullock; Wong, 1995), sendo assim os monócitos e neutrófilos são as primeiras células responsáveis pela inibição do crescimento da *Cândida Albicans* (Sohnle et.al., 1976; Djeu; Blanchard, 1987; Marodi et.al., 1991).

Os fagócitos encontram certa dificuldade em ingerir as leveduras, hifas ou pseudo-hifas do fungo, por serem grandes, então os fagócitos se espalham sobre a superfície da hifa, o que acaba desencadeando a ativação do metabolismo oxidativo, liberando superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e hipoclorito, responsáveis pela morte do agente, esta ativação do metabolismo oxidativo, demonstra a importância dos metabólitos de oxigênio, na atividade fungicida (Sasada, Johnston, 1980).

A fagocitose é responsável pela morte do fungo, mas sua eliminação ocorre, também, através da proliferação epitelial secundária à produção de linfocinas; (Lehrer, 1975; Bortolussi et.al., 1981).

Vários autores descreveram que a maior frequência de infecções por *Cândida* encontra-se entre deficiências ligadas à imunidade

mediada por linfócitos T, entretanto tem sido atribuído importante papel aos fagócitos nos mecanismos efetores contra este patógeno e a participação dos produtos do metabolismo oxidativo tem sido considerada relevante no desempenho desta função (Goldberg et al. et.al. 1971; Rosenblatt; Stiehm, 1983; Kirkpatrick; Smith (1974), Walker; Urbaniak (1980). Kirkpatrick; Smith (1974), verificaram que ocorre um acúmulo de polimorfonucleares e macrófagos circundando o fungo e, ocasionalmente, falha na quimiotaxia, fagocitose, com redução da atividade fungicida. Lawton et al., (1976) confirmaram estas alterações e observaram que podem se encontrar isoladas ou associadas. Snyderman et al., (1973) descreveram que em pacientes com CMC, as células mononucleares não conseguem responder adequadamente com o “burst” oxidativo após a fagocitose dos blastóporos do fungo. Van Scoy et al., (1975), encontraram em pacientes com CMC a associação de hipergamaglobulinemia E, redução de quimiotaxia de neutrófilos, além das alterações da imunidade mediada por linfócitos T. Van Der Meer et al., (1978), notaram uma redução da capacidade fungicida para *Cândida* em monócitos, sem alteração na quimiotaxia ou funções de neutrófilos. Yamazaki et al., (1984), encontraram redução de atividade quimiotática, diminuição da atividade do fator de inibição da migração de monócitos e da fagocitose para *Cândida*, com capacidade bactericida para *Staphylococcus aureus* normal, o que sugere uma alteração específica, em dois irmãos por eles estudados.

1.C.c Outras Imunodeficiências de fagócitos

O reconhecimento de defeitos da imunidade inata tem aumentado nos últimos anos. Os fagócitos são células essenciais neste aspecto e a sua avaliação torna-se ainda mais necessária nas doenças dermatológicas, pois, a pele é frequentemente acometida nas imunodeficiências primárias. Novas imunodeficiências têm sido descritas nos últimos anos, principalmente acometendo a imunidade inata, portanto, condições clínicas não identificadas, passaram a ser diagnosticadas. Também, permanece desconhecida a repercussão destes quadros sobre a função fagocitária e, como consequência, estes quadros podem ser acompanhados de alterações laboratoriais (Tabela 2).

Tabela 2 - Defeitos Congênitos de Fagócitos

Neutropenia congênita grave (AD)	Síndrome de Kostmann (AR)
Neutropenia ligada ao X/ Mielodisplasia	Neutropenia cíclica
Defeito de adesão leucocitária tipo 1	Defeito de adesão leucocitária tipo 2
Deficiência de Rac2	Defeito de adesão leucocitária tipo 3
Periodontite juvenil localizada	Deficiência de beta actina
Deficiência de Grânulo específico	Síndrome de Papillon-Lefèvre
Doença Granulomatosa Crônica ✓ Ligada ao X ✓ Autossômica recessiva	Síndrome de Shwachman-Diamond
Deficiência de Mieloperoxidase	Deficiência de G6PD
Deficiência de IL12p40	Deficiência de cadeia β 1 do receptor de IL-12 e IL23
Deficiência de STAT1 (2 formas)	Deficiência de receptor 1 e 2 de IFN γ
Proteinose alveolar	Hiper IgE AR (deficiência de Tyk2 e AD)

Fonte: **IUIS scientific committee, 1999; Notarangelo et al Primary immunodeficiencies: 2009 update J Allergy Clin Immunol 2009;124:1161-78**

1.D Avaliação da Função Fagocitária

As funções de neutrófilos patológicas são detectadas como defeitos metabólicos permanentes congênitos da NADPH oxidase: Doença Granulomatosa Crônica (DGC) (*Condino e Grumach, 2008*), glutathione peroxidase (*Hoglund et al, 1997*) e Moléculas de adesão. Distúrbios transitórios da fagocitose podem ser detectados nas infecções sistêmicas (*Canturk et.al, 1999*), (*Buchwald et.al, 1999*), pancreatite aguda, tuberculose e Granulomatose de Wegener, assim como em condições especiais como em neonatos, idosos ou em indivíduos sob terapia com citocinas, prednisolona ou anestésicos (*Lun et AL, 2000*).

Os seguintes achados clínicos e laboratoriais indicam a avaliação da função de granulócitos: suscetibilidade aumentada a infecções bacterianas, infecções resistentes a terapia, infecções recorrentes por microrganismos não patogênicos, linfadenite, abscessos hepáticos ou pulmonares, osteomielite, estomatite de repetição ou gengivite. A granulocitopenia e os defeitos de células B devem ser excluídos (*Lun & Schmitt 2000*).

A avaliação das funções fagocitárias é uma prática restrita a poucos laboratórios. Os ensaios existentes são, em sua maior parte, laboriosos e limitados quanto ao número de amostras analisadas num mesmo teste, necessitando, também, de profissional muito especializado. Estes fatores elevam o custo operacional destes exames. Desta forma, faz-se necessário o estabelecimento de critérios que permitam uma triagem inicial dos casos com suspeita clínica de deficiência ligada aos fagócitos, antes de seu encaminhamento para avaliação destas células por métodos mais avançados. É aconselhável associar exames hematológicos e bioquímicos mais simples, de acordo com as manifestações clínicas dos pacientes, que, em certos casos, por si só possibilitam fechar o diagnóstico ou pelo menos direcionar o clínico na solicitação de testes mais específicos para a identificação de determinadas anomalias (*Klebanoff e Clark, 1993; Quie et.al, 1996*) (Tabela 3).

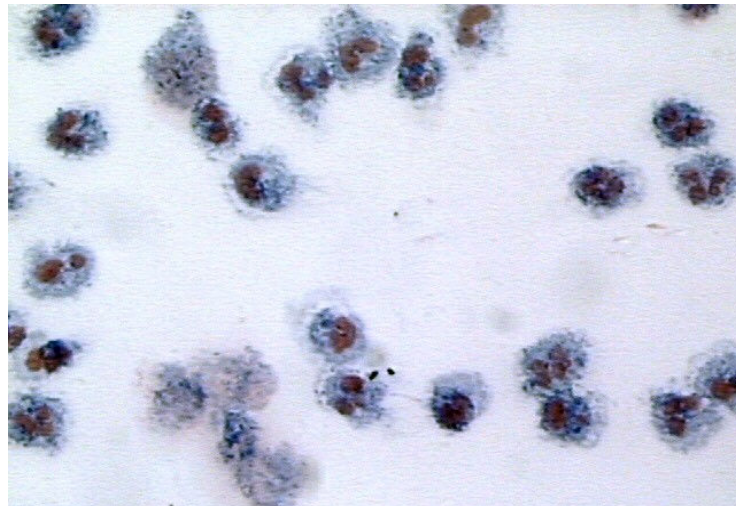
Tabela 3 - Funções fagocitárias, técnicas de avaliação e deficiências diagnosticadas com esta metodologia.

Função	Metodologia	Deficiências
Aderência	Ensaio de aderência em monocamada celular ativada ou não.	Deficiências de adesão: LAD-1 LAD-2 e LAD-3
Quimiotaxia	Migração através de membrana de éster de celulose, ou gel de agarose ou monocamada de células endoteliais, estimulada por fatores quimiotáticos séricos ou sintéticos (ex. C5a, fMLP)	Periodontite localizada juvenil; Distúrbio de polimerização da actina (DPA); Síndromes de Papillon-Lefèvre, da hiper IgE e de Chediak-Higashi ; LAD-1; 2 e 3, DGC, Deficiências de complemento
Opsonofagocitose	Fagocitose de partículas ou microrganismos opsonizados com complemento e/ou anticorpos específicos. (Microscopia, culturas microbiológicas, radiometria, citometria de fluxo).	DPA, LAD-1 (fagocitose mediada por C3bi); Deficiências de complemento (fagocitose mediada por C3b/C3bi) e de imunoglobulinas ou de de imunoglobulinas ou de subclasses (ex. IgG2) (fagocitose mediada por anticorpo específico).
Atividade Microbicida	Fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> , de leveduras de <i>Candida</i> , entre outros. (Microscopia com uso de corantes vitais, culturas microbiológicas).	Doença granulomatosa crônica, Síndrome de Chediak-Higashi, Deficiência de mieloperoxidase, Deficiência de grânulos específicos.
Metabolismo oxidativo	Teste citoquímico do NBT Produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, fótons (Colorimetria, Citometria de fluxo, Quimioluminescência)	Doença granulomatosa crônica (DGC), Deficiências de G6PD, de mieloperoxidase, de glutatona sintetase.

A avaliação funcional dos fagócitos tem como finalidade detectar distúrbios de algumas atividades celulares que ocorrem não somente nas deficiências de fagócitos, mas também em outras imunodeficiências. Dos diferentes procedimentos de avaliação funcional de leucócitos, um deles, o teste **citoquímico de redução do nitrotetrazolio**

azul (NBT- “nitroblue tetrazolium”) (Figura 2), está entre os exames iniciais de triagem para diagnóstico de distúrbios primários de fagócitos. É solicitado para pacientes que apresentam infecções repetidas por *Staphylococcus aureus*, sendo há muito descrito como um teste de referência na identificação de DGC (Baehner e Nathan, 1968). É realizado em lâminas e a leitura é feita pelo biólogo, considerando-se a redução em, pelo menos, 200 células visualizadas (Richardson et al, 1998).

Figura 2 - Teste do nitrotetrazolio azul (NBT) em indivíduo sadio.

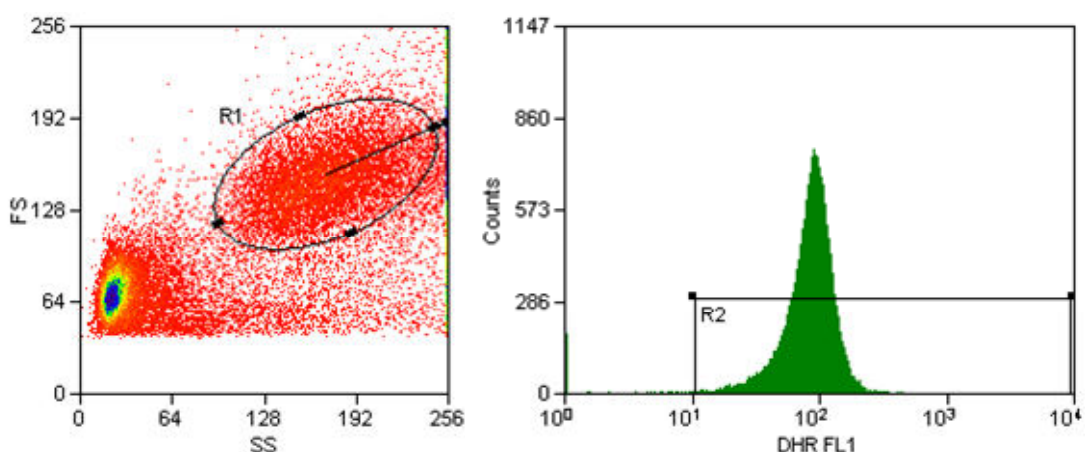


Precipitado azul escuro (precipitado de formazan) decorrente da redução do corante NBT (amarelo) por superóxidos produzido pelo neutrófilo ativado.

Ensaio mais rápidos e fáceis têm sido propostos para a avaliação da via oxidativa pela citometria de fluxo usando o **fluorocromo 1,2,3-Dihidrorodamina (DHR)** (Vowells et al, 1995). O ensaio de DHR baseia-se na formação de H_2O_2 pela ação da enzima superóxido dismutase e, conseqüente formação de um produto fluorescente 1,2,3-rodamina,

quantificada por citometria de fluxo (figura 3) Este ensaio permite a quantificação do H_2O_2 produzido por ação da NADPH-oxidase em cada célula. É um método simples, sensível e qualitativo (Tabela 2).

Figura 3 - Dihidrorodamina (DHR) estimulado com Forbol miristato acetato (PMA) em indivíduo sadio.



Histograma da Citometria: R1 – Região demarcada onde se encontra os granulócitos (Dot Plot- Tamanho X Granulosidade (lin FSC X lin SSC); R2 – Histograma de fluorescência (FL1) As células são ativadas com PMA (phorbol myristate acetate), um potente estímulo da atividade da NADPH oxidase que passam a produzir peróxidos e superóxidos que oxidam a DHR 123 em rodamina 123 com liberação de fluorescência que pode ser quantificada pelo citômetro de Fluxo.

As células (neutrófilos) são ativadas com forbol miristato acetato (PMA), um potente estimulador da atividade da NADPH oxidase. O ensaio é bastante específico, podendo estar alterado em pacientes com deficiência de G6PD e Doença granulomatosa crônica (DGC), também sendo possível detectar subpopulações normais de até 0,1%. A quantidade

de células avaliadas é de 5.000/10.000 eventos e permite a diferenciação entre os eventos oxidativos intra e extracelulares em cada célula e a quantidade de sangue utilizado é pequena (Richardson, et al, 1998) (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre técnicas de avaliação do metabolismo oxidativo: nitrotetrazolio azul (NBT) e dihidrorodamina (DHR).

TESTE DO NBT	TESTE DO DHR
Sangue sem anticoagulante	Sangue heparinizado
Execução em lâmina (aderência de neutrófilos)	Utiliza sangue total em tubos
Contagem de 200 células visualizadas	Contagem de 5.000/10.000 células
Microscopia óptica	Citometria de Fluxo

Fonte: Bellinati-Pires R & Constantino-Silva RN IN Grumach AS Alergia e Imunologia na Infância e Adolescência, 2009,

A **quimiotaxia** de fagócitos está comprometida na maioria das deficiências primárias do sistema fagocitário, mesmo quando outras alterações funcionais são mais relevantes (*Wilkinson, 1986*,: distúrbio de polimerização da actina (DPA) (*Stosse, 1989*), periodontite localizada juvenil (PLJ), LAD-1, LAD-2, síndrome de Chediak-Higashi (CH), deficiência de grânulos específicos (DGE) (*Boxer & Smolen 1988*), Síndrome da hiper imunoglobulina E (hiper IgE) e até em certas formas de doença granulomatosa crônica. Existem inúmeras variações metodológicas para o estudo da quimiotaxia, utilizando-se como fatores quimiotáticos, desde derivados de ativação de complemento, como C5a, citocinas como IL-8, leucotrieno LTB4 e o fMLP, entre os mais empregados. Os métodos mais conhecidos baseiam-se na migração dos leucócitos em câmaras bi-

compartimentalizadas (câmaras de BOYDEN, 1961) através de microporos de membranas de ester de celulose ou em gel de agarose.

Os ensaios de **fagocitose** de microrganismos fazem parte das metodologias mais completas para avaliação das funções dos fagócitos por permitirem observações diretas da capacidade das células de ingerir e destruir uma variedade de patógenos. Poucos são os laboratórios clínicos que executam os ensaios disponíveis para avaliação da função microbicida de fagócitos, sendo utilizados com a finalidade de pesquisa, pois as técnicas empregadas para esta avaliação são trabalhosas, necessitando de um período longo para sua realização. Outras metodologias que são menos trabalhosas necessitam de leitura imediata, por exemplo, em microscopia óptica (técnica com fluorocromo laranja de acridina) (*Bellinati-Pires et.al, 1989*). Alguns laboratórios clínicos realizam este ensaio através de ensaio microbiológico de cultura quantitativa após um período de incubação das células fagocitárias com o microrganismo alvo, determinando-se a morte microbiana pelo decréscimo do número de unidades formadoras de colônia (“colony forming units” – cfu) (Mackanes, 1960).

Vários outros métodos têm sido propostos para avaliação da fagocitose tal como a opsonofagocitose de leveduras com uso de partículas de látex, zimosan, eritrócitos, agregados de IgG, bactérias e leveduras (Leijh et.al.,1986). O tempo de execução dos testes atuais, a necessidade de associação destes métodos com outros procedimentos tecnológicos para avaliação da ingestão dos microrganismos aumenta o custo operacional e

limitam sua utilização em laboratórios clínicos. Atualmente, em laboratórios de maior recurso, vem-se empregando a técnica para **avaliação de fagócitos por citometria de fluxo**. Defeitos de fagócitos podem ser identificados em ensaios que utilizam microrganismos corados com substâncias fluorescentes (Wilson et. al.,1985; Derer et.al.,1983). Este ensaio, além de ser mais rápido, menos trabalhoso e mais sensível que os demais, permite que o volume de sangue coletado dos indivíduos (principalmente em crianças) seja o mínimo possível (Tabela 5).

Tabela 5 - Estudos publicados de avaliação da função fagocitária em indivíduos adultos saudáveis.

Autores	N	Metodologia	Forma de avaliação
Verhoef et.al,1977	7	Capacidade bactericida com marcação com lisostafina e Timidina H ³	Cinética da fagocitose e morte bacteriana em polimorfonucleares e monócitos
Peterson; Verhoef, 1977	10	Capacidade bactericida com marcação c/timidina H ³ em 3 cepas de bactérias diferentes	Cinética da fagocitose e morte bacteriana por PMN E MN, com incorporação de lisostafina e H ³ (leitura em contador)
Smith;Rommel, 1977	NR	Capacidade bactericida com fluorocromo laranja de acridina	Microscopia de fluorescência (morfologia dos leucócitos e das bactérias fagocitadas: mortas, vivas, intra e extracelular.
Perticarari et.al, 1994	45	Ativação do burst respiratório através de Hydroethidine (HE), capacidade bactericida com Brometo de etídio (BE)	Avaliação da técnica por citometria de fluxo
Bellinati-Pires et.al, 1995	165	Capacidade bactericida com fluorocromo laranja de acridina e lisostafina	Leitura das bactérias intra e extracelular em neutrófilos e monócitos por microscopia de fluorescência
Krumholz & Endrass, 1995	10	Fagocitose e Morte de s.aureus com laranja de acridina- MO	Efeito dos agentes anestésicos na fagocitose e morte de s.aureus por agentes anestésicos
Shiloh et al, 1997		Fagocitose e Capacidade bactericida	Ensaio em microplaca mostra a fluorescência para avaliar a sobrevivência de bactérias e capacidade fagocítica gerando fluorescência. Tal relação possibilita verificar a quantidade de bactérias de forma acurada, sendo altamente sensível, prática e de baixo custo
Saresella, 1997	NR	Aderência, opsonofagocitose e morte para Candida albicans por citometria	Sugere a aplicação dos ensaios em doenças infecciosas e imunossupressão
Richardson, 1998	12	Comparação de NBT X DHR	Indica DHR para neonatos por utilizar menos volume de sangue
Lehman, 2000	NR	Avalia fagocitose de zymosan e patógenosopsonizados ou não com soro de pacientes hipogamaglobulinemia	Avaliação das peculiaridades das técnicas
Salih & Husfeld, 2000	25	Fagocitose, explosão oxidativa e capacidade bactericida e fungicida	Estabeleceram a possibilidade de aplicação destas técnicas em 2 horas de ensaios
Plested et al, 2001	NR	Capacidade bactericida com microesferas de látex, ativação do burst respiratório com dihidrorhodamina (DHR)	Avaliação qualitativa por Citometria de fluxo
Beilin et al., 2005	NR	Fagocitose com "beads"	Redução da fagocitose com células tratadas com morfina e sem efeito após tramadol

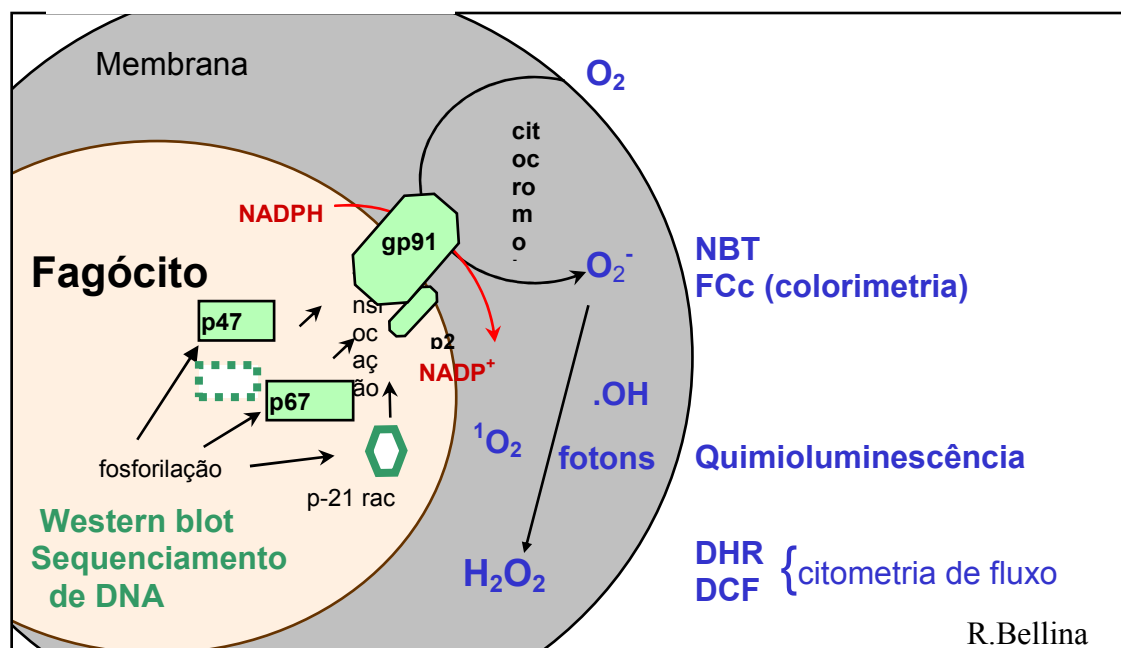
A relevância do papel das células fagocitárias na defesa é reconhecida há mais de um século (Metchnikoff, 1887), mas os mecanismos microbicidas destas células ainda são pouco estudados, particularmente em situações de alterações do sistema imunológico e nas infecções, existindo inúmeras lacunas no entendimento destas atividades celulares em pacientes com diversos defeitos imunológicos.

Como foi apresentado, a DGC ocorre em pacientes com mutações dos componentes da NADPH oxidase que são incapazes de produzir O_2^- devido a uma estrutura ou ativação defeituosa da holoenzima oligomérica dos componentes citossólicos ou de membrana (Figura 4). Em polimorfonucleares não ativados, a enzima está dissociada e inativa: as proteínas citossólicas phox (p47^{phox} ou organizadora, p67^{phox} ou ativadora e a p40^{phox}) formam um complexo em um estado desfosforilado, o flavocitocromo b558 heterodimérico integrado à membrana (subunidades da NADPH oxidase 2 e p22^{phox}) nas vesículas secretórias ou membranas de grânulos específicos e Rac é mantido em um complexo citoplasmático ligado a GDP (Ohno ET al, 1985; Groemping; Rittinger, 2005; Lapouge ET al, 2002). Além da ativação direta da NADPH oxidase por certos estímulos, tais como o PMA, um estado adicional de ativação ocorre sob estimulação dos receptores de superfície tais como o TLR4, o receptor de sinalização do LPS bacteriano (DeLeo ET al, 1998). Esta estimulação permite a marginação dos PMN da vasculatura para os tecidos e quimiotaxia para os locais da infecção quando ativados. O Lipopolissacáride (LPS), um componente imunoestimulante da membrana externa da maioria das bactérias Gram

negativas, não causa ativação significativa da NADPH oxidase mas aumenta intensamente a geração de $O_2^{\cdot -}$ em resposta a um estímulo secundário como fMLP. Os PMN originados mostram uma organização alterada da NADPH oxidase, nos grânulos secundários intracelulares e vesículas contendo NADPH oxidase 2 fundido com fagossomas seguido pelo recrutamento de subunidades phox citossólicas fosforiladas e de GTP-Rac (Zhao ET AL, 2003). A ativação completa da NADPH oxidase requer sinais adicionais e resulta na transferência de electron da NADPH citoplasmática para o oxigênio molecular, culminando na produção de $O_2^{\cdot -}$, um precursor de vários compostos antimicrobianos potentes importantes para a resposta imune inata do hospedeiro à infecção. Os sinais que se seguem de TLR4 à NADPH oxidase ainda estão sendo delineadas. Desta forma, várias novas imunodeficiências tais como as mutações do modulador essencial NF- κ B (*NF- κ B essential modulator*) tais como nas doenças como NEMO (domínios do zipper da leucina e “zinc finger” da proteína NEMO) e IRAK4 (defeito na via de sinalização TLR/IL-1R/IL-18R) (Singh ET AL, 2009).

As aplicações das técnicas de avaliação da função fagocitária em diversas doenças estão descritas na Tabela 6.

Figura 4 - Metabolismo oxidativo, métodos de avaliação e de identificação dos tipos de DGC.



Ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$), nicotinamida-adenina de nucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e oxidada (NADP⁺); proteínas do citosol associadas ao sistema NADPH oxidase (p47 phox, p67 phox, p40 phox e p-21 rac), proteínas do citocromo b 558 (gp 91 phox e p22 phox), NBT ("nitroblue tetrazolium"), FCc (ferricitocromo c), DHR (dihidrorodamina), DCF (diclorofluoresceína).

Fonte: Bellinati-Pires R & Constantino Silva RMN Avaliação dos Fagócitos IN Grumach AS Alergia e Imunologia na Criança e no adolescente, 2009.

Tabela 6 - Estudos realizados de avaliação da função fagocitária em várias doenças.

Lehrer & Cline, 1969	pacientes com infecções fúngicas (<i>C. albicans</i>)	N/R	Ensaio quantitativo da atividade fungicida baseado na coloração de azul de metileno	Neutrófilos mataram 7.4% de <i>C. albicans</i> ingerida em 1h e a coloração de azul de metileno mostrou-se apropriada para tal tipo de avaliação.
Lun et al, 2000	DGC heterozigotos	7	Kit Phagoburst e Phagotest vs DHR (Citometria de fluxo) e Fagocitose	A citometria permite quantificação exata em tempo mais curto.
Soler-Palacín et.al, 2007	DGC	13	NBT e DHR	Confirmação do diagnóstico
Pattanapanyasat et al, 2007	Talassemia S/N amostra	N/R	Fagocitose e morte de <i>Candida albicans</i> (Citometria de Fluxo)	Método para avaliar em amostras pequenas de sangue
Marks et al, 2009	Doença de Crohn	N/R	Mutação da NADPH-oxidase	Nenhum trabalho com n suficiente para confirmação
Scholnicoff et al, 2009	Portadora de DGC	1	DHR	Descrição de caso clínico
Oppenheim, 2007	DGC	N/R	Fagocitose e Morte de <i>S.aureus</i> por citometria e Produção de superóxido por espectrofotômetro	Ausência de morte em pacientes com DGC
Marks et al, 2009	Doença de Crohn	N/R	Mutação da NADPH-oxidase	Nenhum trabalho com n suficiente para confirmação

*N/R – Não Referido

Considerando-se a avaliação da atividade funcional, enfatiza-se a versatilidade dos ensaios de quimiotaxia e de fagocitose por permitirem avaliação do soro quanto à presença de opsoninas e fatores quimiotáticos, sendo úteis ao esclarecimento de outras deficiências, não ligadas diretamente aos fagócitos, como por exemplo, as deficiências de componentes do sistema complemento e de imunoglobulinas.

Como foi descrito, as manifestações cutâneas estão presentes em cerca de 80% das imunodeficiências primárias. Embora as

técnicas de avaliação funcional de fagócitos tenham sido descritas há mais de 40 anos, o acesso a estes testes é restrito a poucos centros de pesquisa. Além disso, um número crescente de imunodeficiências primárias está sendo descrito nos últimos anos e a interrelação entre os outros mecanismos da imunidade inata ainda são pouco conhecidos. Desta forma, é possível que testes mais simples possam ser utilizados para a triagem de outros defeitos imunológicos não definidos como Doença Granulomatosa Crônica. Faz-se necessário avaliar o ensaio que poderá fornecer maior número de informações com relação a essas células e, possivelmente estabelecer métodos imunológicos mais acessíveis a outros serviços com capacidade de diagnóstico imunológico.

2 OBJETIVOS

Considerando-se a relevância de se avaliar a função fagocitária, o presente estudo tem como finalidade:

- a) Avaliar a aplicação das técnicas de avaliação fagocitária em distúrbios de fagócitos.

Objetivos secundários:

- a) Avaliar a função fagocitária em manifestações dermatológicas sem etiologia definida;
- b) Avaliar o comprometimento do sistema complemento nas doenças fagocitárias;

3 CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3.A Casuística

A padronização das técnicas laboratoriais foi realizada em amostras de indivíduos sadios voluntários cuja coleta de sangue foi feita por ocasião de outros exames de rotina realizados no Laboratório de Investigação Médica 56 do Depto de Dermatologia da FMUSP ou da Faculdade de Medicina do ABC. Após o estabelecimento dos padrões de normalidade em uma população sadia, todos os ensaios foram realizados nos pacientes e, simultaneamente, em amostras coletadas de indivíduos sadios no mesmo dia. Os ensaios foram aplicados em pacientes com diagnóstico de imunodeficiências primárias: Doença Granulomatosa Crônica e portadores e Candidíase Mucocutânea Crônica. Outros dois grupos sem imunodeficiência primária estabelecida, mas, com manifestações clínicas semelhantes a estas doenças foram avaliados: pacientes com Candidíase Persistente e sem diagnóstico definido (Tabela 7).

Os pacientes incluídos estavam matriculados e foram acompanhados no Ambulatório de Manifestações Cutâneas das Imunodeficiências Primárias do Departamento de Dermatologia, FMUSP. O protocolo foi aprovado pelas Comissões de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da Faculdade de Medicina do ABC. As coletas de sangue foram realizadas

mediante consentimento livre e informado pelos indivíduos sadios e pacientes (anexos I, II e III).

Tabela 7 - Pacientes incluídos para a realização das técnicas de avaliação fagocitária.

Grupos estudados
Controle: voluntários sadios
Pacientes com DGC e Portadores de DGC
Pacientes com Candidíase Mucocutânea Pacientes com Candidíase Persistente
Pacientes com sintomatologia sugestiva de acometimento de fagócitos

Os pacientes com **Doença Granulomatosa Crônica (DGC)** foram diagnosticados segundo as manifestações clínicas e com a confirmação após o teste do NBT e/ou DHR (Tabela 8). Também foram coletadas amostras de mães das crianças para avaliar a situação de portador de DGC. Todos os pacientes avaliados eram do sexo masculino. Em três das mães de pacientes havia manifestações clínicas: hidrosadenite (TFP), aftas persistentes (PN, PMS) (Figura 5). Incluiu-se uma paciente portadora de DGC avaliada por DHR e NBT cuja manifestação clínica foi pneumonia provavelmente por *Staphylococcus* e associada a cavitação à radiografia.

Tabela 8 - Dados clínicos dos pacientes com Doença Granulomatosa Crônica.

	sexo	idade ao exame	manifestações clínicas
RCSS	M	1 ano e 4 m	Bcp (2x), abscesso cervical, piodermite
RLR	M	-	Bcp de repetição
RCS	M	33 anos	Piodermite, Bcp, abscesso hepático
TFP	M	10 anos	Bcp, obstrução intestinal, osteomielite
PN	M	6 m	Disseminação da vacina BCG, fístula perianal
CLSS	M	1 mês	Bcp, piodermite
PMS	M	2 anos	Febre de causa indeterminada, piodermite, adenomegalias com drenagem, cicatriz de BCG de 3 cm, celulite, mastoidite

Bcp = broncopneumonia

Figura 5 - Lesões apresentadas por mãe de paciente com Doença Granulomatosa Crônica.



Para o diagnóstico de **Candidíase Mucocutânea Crônica** (CMC) além das características clínicas, os pacientes foram avaliados por culturas de linfócitos com mitógenos e antígenos específicos, dentre os quais *Candidina*. Todos os pacientes foram confirmados com resposta linfocitária deficiente para *Cândida*. Os critérios de diagnóstico utilizados

para CMC foram aqueles da Organização Mundial de Saúde (Moberken; Moberg, 1986) (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados clínicos de Pacientes com Candidíase Mucocutânea Crônica.

Paciente	Idade (anos)	Quadro Clínico
NRSP	31	CMC, Lúpus Eritematoso disseminado
FMS	37	CMC, Poliendocrinopatia, Displasia ectodérmica (APECED)
PAMS	22	CMC
MAC	7	CMC
MRP	65	CMC (mãe de NRSP)
MIVF	51	CMC
RL	24	CMC, Miopatia por T. Hashimoto

Pacientes com quadro de candidíase persistente e que não preenchem os critérios de diagnóstico de Candidíase Mucocutânea Crônica, foram avaliados. A Candidíase persistente foi estabelecida para os indivíduos não responsivos ao tratamento e/ou que necessitavam anti-fúngicos continuamente. Foram excluídos pacientes que apresentavam fatores predisponentes para Candidíase, tais como: desnutrição, diabetes *mellitus*, neoplasias, uso de medicações imunossupressoras e infecção persistente pelo HIV (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados clínicos de pacientes com Candidíase persistente (CP).

	Idade (anos)	Quadro clínico
JFS	66	CP esofágica, diabetes, gastrite com Helycobacter
JPFS	41	Deficiência de IgA, rinite e candidíase persistente
FMA	22	Candidíase persistente
AMN	63	Candidíase esofágica
MLT	50	Candidíase esofágica
AJM	51	Candidíase persistente
GTOZ	18	Candidíase esofágica

Os dados clínicos de pacientes que apresentaram manifestações clínicas sugestivas de distúrbios de fagócitos estão descritos na tabela 11. Para melhor compreensão dos pacientes incluídos nos casos com manifestações clínicas sugestivas de distúrbios de fagócitos, incluiu-se as Figuras 6 e 7.

Tabela 11 - Dados clínicos de pacientes com manifestações sugestivas de distúrbios de fagócitos.

	Idade	Dados Clínicos
VDP	1 ano e 2 meses	Campylobacter aos 6m, mastoidite por Pneumo aos 8 meses,
LFN	4 anos 3 meses	Psofte por Staphylococcus, aftas frequentes, amigdalites, sinusite, BCP
DQM	18 anos	Infecções supurtivas de repetição, hepatesplenomegalia
VX	23 anos	Chediak Higashi
GHS	6 anos e 7 meses	BCP (8x), Otites (4x), peritonite por Klebsiella e Enterobacter, aspergilose pulmonar, miopatia, varicela (2x)
DC	2 anos 4 meses	Hipoglicemia por erros inatos, BCP, otites, febre persistente, leucopenia, cavitação em RX do LSD
GVC G	9 anos	Mastoidite resistente a tratamento, febre persistente, choque séptico
BBS	18 anos	Síndrome de Hiper IgE
LBS	6 anos e 7 meses	Otites supurativas, sinusites, BCP, celulites.
LMS	14 anos	Dermatite atópica grave, osteopenia, suspeita de Hiper IgE
PRS	30 anos	Deficiência de G6PD, infecção recorrente do SNC
JASF	29 anos	Meningite por criptococo
VH	10 anos	Síndrome de Papillon-Lefevre
EFS	15 anos	Síndrome de Netherton
SF	1 ano	Síndrome de Hiper IgE

Figura 6 - Lesões de pele infectadas em Paciente com Síndrome de Hiper IgE

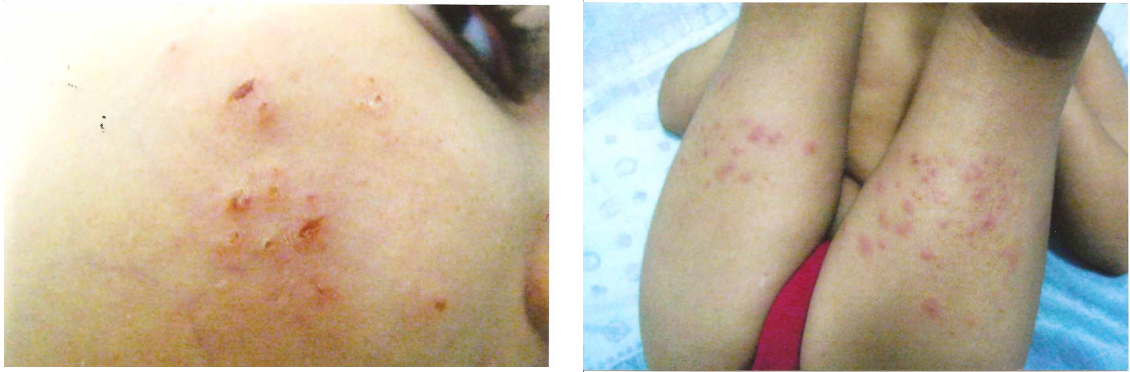


Figura 7 - Paciente com Síndrome de Netherton



Foram realizados os seguintes exames laboratoriais:

- a) Avaliação do burst oxidativo pelo método da dihidrorodamina (citometria de fluxo) e do teste do Nitroblue tetrazolium (NBT);
- b) Avaliação da capacidade quimiotática (Boyden modificada);

- c) Fagocitose e aderência de bactérias e fungos (citometria de fluxo);
- d) Avaliação da morte intracelular (citometria de fluxo);
- e) Ensaio hemolítico para avaliação da integridade das vias clássica (CH50) e alternativa (AP50).

3.B Métodos

3.B.a Teste de Redução do NBT (Nitroblue tetrazolium)

A redução do corante NBT foi avaliada pelo teste citoquímico, modificado do ensaio descrito por Park (1968).

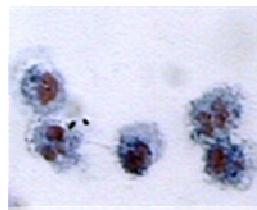
Antes do início da técnica, propriamente dita, as lâminas para microscopia foram lavadas com detergente enzimático e incubadas por 30 minutos em câmara úmida em estufa de CO² a 37°C. Foram feitas duplicatas de cada controle e cada paciente e 6 a 8 gotas de sangue total coletado em tubo seco, foram colocadas em cada lâmina e, a seguir, novamente incubadas por 30 minutos (câmara úmida, estufa de CO² a 37°C). As lâminas da estufa foram lavadas com meio RPMI a 37°C para retirada dos coágulos sanguíneos. Foram preparadas duas lâminas de cada amostra somente com NBT a 1mg/mL (500 µl), isto é, sem estímulo e outras duas lâminas com forbol miristato acetato (PMA) a 2 µg/ml para a ativação do metabolismo oxidativo. A seguir, procedeu-se novamente a incubação em estufa por 15 minutos, lavagem com RPMI a 37°C e após a secagem, foram

coradas com exposição a um minuto em álcool metanol absoluto e três minutos em safranina. A contagem das 200 células de cada lâmina foi executada em microscópio óptico. A ativação do metabolismo oxidativo das células faz com que a redução do corante amarelado forme cristais de formazana de cor azul escuro (NBT). Os resultados foram expressos em percentual de fagócitos com os cristais azul escuro em seu interior. Considerou-se acima de 95% dos neutrófilos estimulados a reduzir o NBT, como resultado normal (Figura 8).

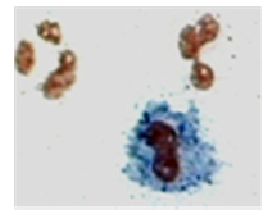
Figura 8 - Teste do NBT em indivíduo sadio e indivíduo portador de DGC.



Células sem estímulo



Células com estímulo



Células Indivíduo portador de DGC

3.B.b Oxidação da Dihidrorodamina (DHR) por Citometria de Fluxo

Neste experimento, o preparo das amostras foi realizado utilizando-se o protocolo de Holland, 1997. Foram coletados 5ml de sangue de cada indivíduo em tubos estéreis com o anticoagulante heparina sódica na concentração de 50U/mL. Para cada indivíduo, 03 tubos de poliestireno foram preparados: tubo 1 sem estímulo (solução de Hanks), tubos 2 e 3 com estímulo (DHR + PMA).

Cada tubo recebeu 100µl de sangue total, 5µl de catalase e 50µl de DHR na concentração de 1mM/mL. Os tubos foram incubados em banho-maria por 5 minutos a 37°C, em agitação contínua e, logo em seguida, acrescentou-se 100µl de PMA (2µg/mL) nos tubos com estímulo e 100µl de solução de Hanks no tubo sem estímulo. A seguir, incubou-se novamente em banho-maria a 37°C, com agitação contínua e, ao final, adicionou-se 3 mL de solução de lise em cada tubo para lise total das hemácias; e posteriormente, incubou-se em gelo por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2000rpm, descartando-se o sobrenadante, restando as células que foram lavadas com solução de Hanks. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 1mL de solução de Hanks e a leitura foi feita em Citometro de Fluxo (*EPIC X Coulter®* na FMUSP e *Guava Easycite mini system®* na FMABC). A fluorescência emitida foi colhida em escala logarítmica onde o DHR foi medido em 530 ±30 nm (para o Coulter) e 525 ± 30 nm (para o Guava) detector de FL1. De cada amostra analisada no Citômetro Coulter foram adquiridos 10.000 eventos e os dados coletados foram analisados pelo software cell Quest Pró (Becton Dickison Immunocytometry systems) e de cada amostra analisada no Citômetro Guava foram adquiridos 5.000 eventos e os dados coletados foram analisados pelo software cytosoft guava system versão 4.2. A detecção das fluorescências das populações celulares foi feita através de um fluxo contínuo individualizado de cada célula; estas células passaram por uma fonte luminosa a laser gerada pela excitação de um laser de argônio. A aquisição e discriminação das subpopulações celulares foram realizadas

através de parâmetros de desvio angular a 90° (SSC), granulidade e da dispersão da luz emitida e intensidade de fluorescência para FL1. O SSC foi calibrado para avaliar populações heterogêneas de células presentes nas amostras (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Representação esquemática dos reagentes no teste da Dihidrorodamina para avaliar a explosão oxidativa

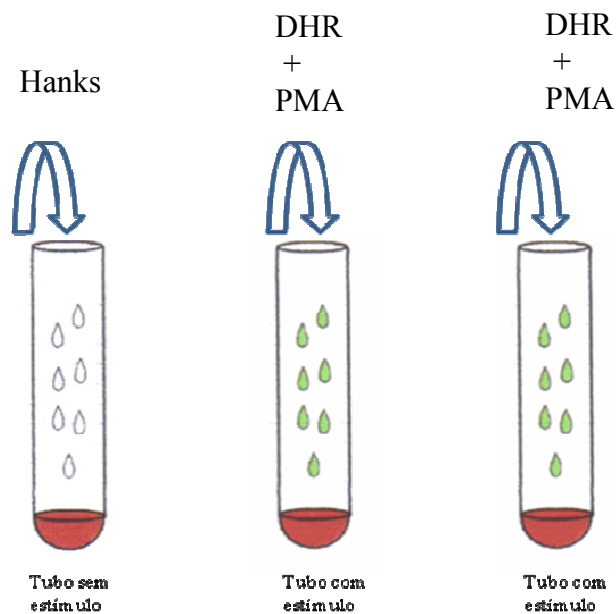
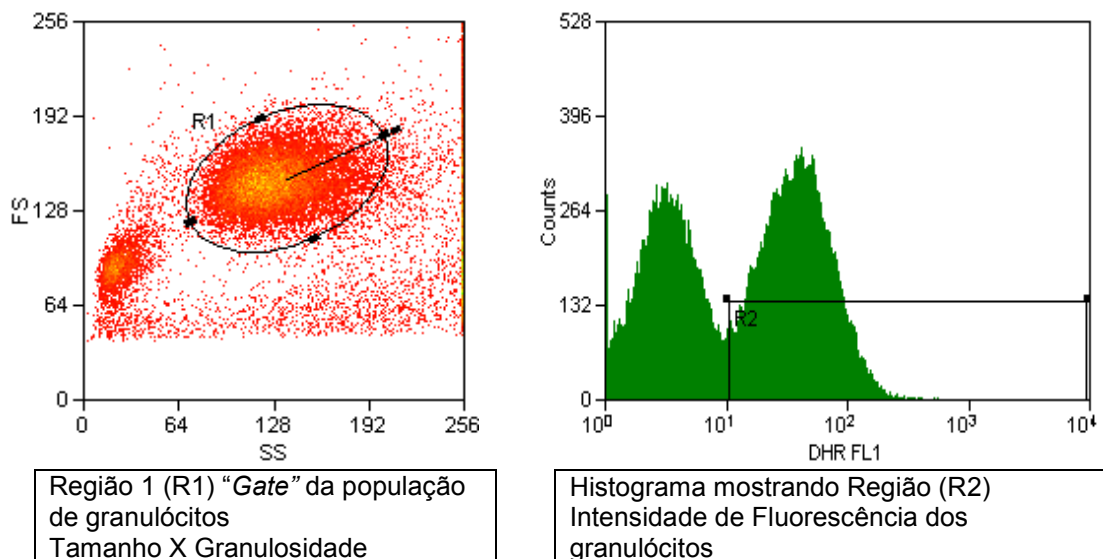


Figura 10 - Teste da Dihidrorodamina em indivíduo portador de DGC.



3.B.c Avaliação da Quimiotaxia

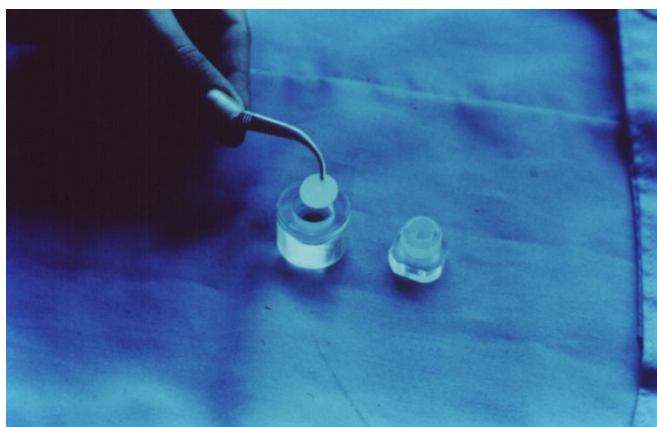
Para o ensaio de quimiotaxia, 15 ml de sangue de cada paciente foram coletados, em tubos estéreis, contendo heparina sódica na concentração de 50U/mL e realizada a técnica modificada de Boyden (1962). Logo após a coleta, o sangue foi incubado com 3 mL de Dextran por 1 hora, em estufa de CO₂ à 37°C, para sedimentação dos polimorfonucleares. Após o período de incubação, retirou-se o botão de células e o sobrenadante; lavou-se em meio de RPMI para retirar todas as impurezas do Dextran das células. Sempre utilizando centrifugas refrigeradas, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm, por 15 minutos cada. Após a lavagem das células, as mesmas foram contadas em aparelho CELL DYN e, então, ajustadas para uma concentração final de 2×10^6 células por mL.

Para cada experimento utilizou-se 500 µL de células para cada câmara de Boyden (Figura 11). Para cada indivíduo foram preparadas 10 câmaras de Boyden, sendo:

- a) 02 câmaras utilizadas para células sem estímulo,
- b) 02 câmaras para células estimuladas com Lipopolissacaride de *E.Coli* opsonizado com soro AB;
- c) 02 câmaras para células estimuladas com Lipopolissacaride de *E.Coli* opsonizado com soro autólogo e,

- d) 02 câmaras para células estimuladas com *Cândida Albicans* (ATCC 10231 - Instituto Adolfo Lutz – Setor de Microbiologia)) opsonizadas com soro AB;
- e) 02 câmaras para células estimuladas por *Cândida Albicans* (ATCC 10231 - Instituto Adolfo Lutz – Setor de Microbiologia)) opsonizadas com soro autólogo.

Figura 11 - Câmara de Boyden utilizada para o ensaio de quimiotaxia.

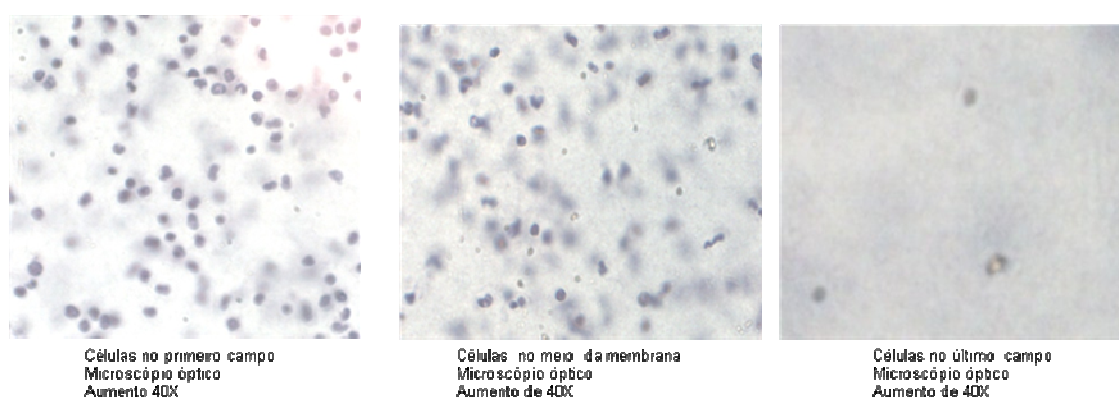


Legenda: O fator quimiotático (soro AB ou soro do próprio paciente contendo componentes do complemento) foi colocado no compartimento inferior e as células, no compartimento superior.

A opsonização das células foram feitas com soro AB e soro autólogo para cada experimento e os tubos foram incubados em banho maria à 37°C, com agitação contínua. Após o período de incubação, o fator quimiotático foi colocado em seus respectivos poços na câmara de Boyden (compartimento inferior), as membranas de 3 micras (Millipore) para neutrófilos foram adicionadas em cada poço e na parte superior foram adicionadas células na concentração final de 2×10^6 células/mL. As câmaras foram então incubadas em estufa de CO² a 37° C e após este período, as membranas foram então retiradas e coradas para leitura em microscopia

óptica. A leitura das membranas se deu através de 20 campos onde se via a primeira camada com o valor maior de células e mais 20 campos onde se via no máximo 3 células, os resultados foram emitidos em *micras* (μ) e os valores de referência para o laboratório foram estabelecidos (Figura 12).

Figura 12 - Imagem microscópica das células após quimiotaxia em membrana de éster celulose em 3 campos.



3.B.d Avaliação da Fagocitose e aderência de bactérias *Staphylococcus aureus*.

Preparo das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 12598

As bactérias foram cultivadas e conjugadas conforme protocolo de Saresella M., et.al, 1997, como segue. As bactérias foram cultivadas em Agar sangue por 48 horas; as colônias de bactérias foram repicadas e colocadas em tubos estéreis contendo meio enriquecido líquido (BHI) e incubadas por 24 horas em estufa de CO² a 37⁰C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram eliminados e a camada de bactérias lavada por 2x em solução de Hanks. Após o processo das lavagens, as bactérias foram ressuspensas em

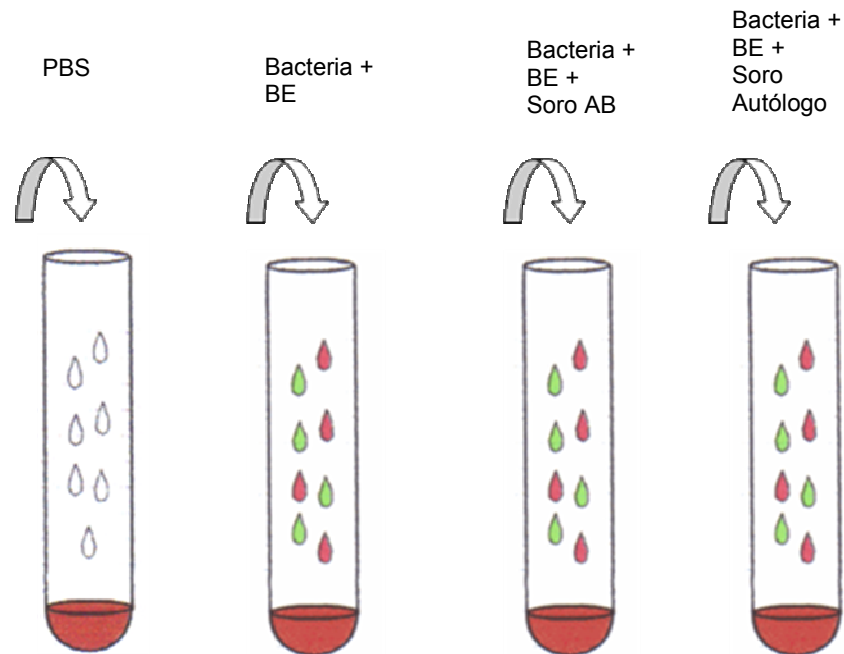
solução de Hanks e ajustadas para 7×10^9 /mL em espectrofotômetro. A marcação foi feita com 0,01mg de Fitc (*Fluorescein isothiocyanate isomer I*) por 30 minutos, em banho-maria, com agitação contínua; as bactérias foram lavadas 2 vezes em solução de Hanks, ajustando-se a concentração final das bactérias para 5×10^6 cels/mL. Assim, as bactérias foram estocadas a 4°C, protegidas da luz até o momento do uso. A viabilidade da bactéria foi determinada pelo azul de tripan (Merck S.A. Ind.Químicas, RJ) em câmara de Neubauer.

Opsonizacao das Bactérias

As bactérias, após cultivo, foram inativadas à 60 °C, em banho-Maria, com agitação por uma hora. A seguir, a opsonização das bactérias foi feita com soro AB (controle positivo) e com soro autólogo. Bactérias, previamente marcadas com Fitc (como descrito acima) e inativadas, na concentração de 5×10^6 cels/mL foram incubadas com 10% de soro AB ou soro autólogo, em banho maria (37°C) por 30 minutos, sob agitação contínua. Após, as bactérias foram lavadas em tampão PBS por 2 vezes e ressuspensos ao volume inicial de cada tubo.

Para o ensaio de fagocitose e aderência de bactérias, propriamente ditos, foram utilizados 5 ml de sangue de cada indivíduo, coletados em tubos estéreis contendo heparina sódica. O ensaio iniciou-se com a marcação dos tubos de poliestireno totalizando um total de 4 tubos para cada individuo numerados de 1 a 4, sendo que cada tubo recebeu um determinado estímulo conforme figura 13.

Figura 13 - Representação esquemática dos reagentes no experimento de fagocitose e aderência de *S.aureus* (BE=Brometo de etídio).



Sendo assim, todos os tubos receberam 100ul de sangue total.

Tubo número 1: não recebeu nenhum tipo de estímulo ficando apenas com as células sanguíneas;

Tubo de número 2: Bactérias inativadas marcadas com Fitc e Brometo de Etídio;

Tubo de número 3: bactérias inativadas marcadas com Fitc e previamente opsonizadas com soro AB e Brometo de Etídio;

Tubo de número 4: bactérias inativadas marcadas com Fitc, previamente opsonizadas com soro autólogo e Brometo de Etídio.

O tubo 1, sem estímulo, foi posto em banho de gelo até o momento da lise das hemácias. Os tubos restantes 2, 3 e 4 que receberam bactérias inativadas sem opsonização, bactérias com soro AB e bactérias com soro autólogo, respectivamente, foram incubados por 30 minutos, em banho-maria (37°C), sob agitação contínua. Após este período, adicionou-se 2 ml de tampão PBS para retirada de bactérias não fagocitadas, centrifugando-se por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 3ml de tampão de lise, foram incubadas por 20 minutos e após a incubação foram centrifugadas e lavadas novamente por duas vezes em tampão PBS. As amostras receberam 200ul de Brometo de Etídio (1ug/ml) e foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. A seguir, as amostras foram lavadas novamente em PBS e após o descarte do sobrenadante completou-se os tubos com PBS para um volume final de 1 mL. Procedeu-se à leitura no citômetro de fluxo como relatado para o ensaio de DHR obtendo-se a fluorescência emitida em escala logarítmica onde Fitc foi medido em 530 ±30 nm (para o Coulter) e 525 ± 30 nm (para o Guava) detector de FL1.

3.B.e Avaliação da Fagocitose e aderência de Fungo *Candida albicans*.

Preparo das cepas de *Candida albicans* ATCC 10231

Antes do uso, os fungos foram cultivados e conjugados conforme protocolo de Saresella M., et.al, 1997, como segue. Os fungos foram cultivados em Agar sangue por 48 horas; as colônias de fungos foram

repicadas e colocadas em tubos estéreis contendo meio enriquecido líquido (Caldo Saboraud – Dextrose 2%) e foram incubados por 24 horas em estufa de CO² a 36^oC. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram eliminados e a camada de fungos lavadas por 2x em solução de Hanks. Após o processo das lavagens, os fungos foram ressuspensos em solução de Hanks, contados um total de 7X10⁹/mL e marcados com FITC. Os fungos foram incubados com 0,1mg de Fitc (*“Fluorescein isothiocyanate isomer I”*) por 60 minutos; em seguida, os fungos foram lavados em solução de Hanks e ressuspensos para 1x10⁶/mL para uso. A viabilidade do fungo foi determinada pelo azul de tripan (Merck S.A. Ind. Químicas – RJ) em câmara de Neubauer.

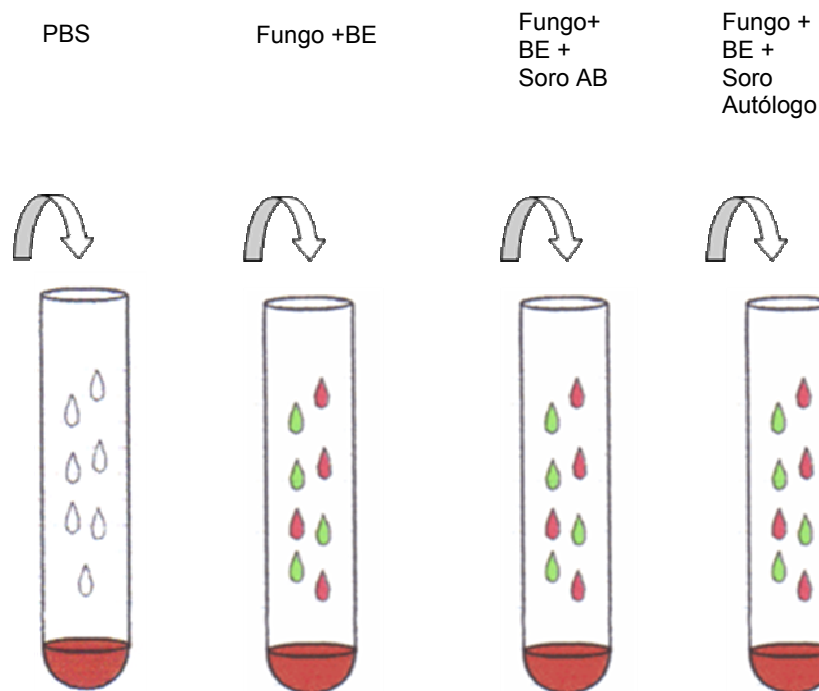
Opsonizacao dos Fungos

Os fungos após cultivo foram inativados a 60 °C em banho-Maria com agitação por 1 hora. A opsonização dos fungos foi feita com soro AB (controle positivo) e com soro autólogo, como descrito a seguir. Fungos previamente marcados com Fitc (como descrito acima) e inativados, na concentração de 7 X 10⁹ cels/mL, foram incubados com 10% de soro AB ou soro autólogo, em banho maria (37^oC) por 30 minutos, sob agitação contínua. Após, os fungos foram lavadas em tampão PBS por 2 vezes e ressuspensos ao volume inicial de cada tubo.

Para o ensaio de fagocitose e aderência de fungos, foram utilizados 5 ml de sangue de cada indivíduo, colhidos em tubos estéreis, contendo heparina sódica. O ensaio iniciou-se com a marcação dos tubos de

poliestireno totalizando um total de 4 tubos para cada individuo numerados de 1 a 4, sendo que cada tubo recebeu um determinado estímulo conforme Figura 14.

Figura 14 - Representação esquemática dos reagentes no experimento de Fagocitose e aderência de *Candida albicans*



Sendo assim, todos os tubos receberam 100ul de sangue total.

Tubo número 1: não recebeu nenhum tipo de estímulo ficando apenas com as células sanguíneas;

Tubo número 2: fungos inativados marcados com Fitc e Brometo de Etídio;

Tubo de número 3: fungos inativados marcados com Fitc previamente opsonizadas com soro AB e Brometo de Etídio;

Tubo de número 4: fungos inativados marcados com Fitc previamente opsonizados com soro autólogo e Brometo de Etídio.

3.B.f Avaliação da morte Intracelular de bactérias *Staphylococcus aureus*.

Oponização das Bactérias

A opsonização das bactérias foi feita com soro AB (controle positivo) e com soro autólogo, como descrito a seguir. Bactérias marcadas com Fitc na concentração de 5×10^6 cels/mL (como descrito acima), foram incubadas com 10% de soro AB ou soro autólogo, em banho maria (37°C) por 30 minutos, sob agitação contínua. Após a incubação, as bactérias foram lavadas em tampão PBS por 2 vezes e ressuspensas ao volume inicial de cada tubo.

Morte intracelular

Para o ensaio de morte intracelular foram utilizados 5 ml de sangue de cada indivíduo, colhidos em tubos estéreis contendo heparina sódica. O ensaio iniciou-se com a marcação dos tubos de poliestireno totalizando um total de 8 tubos para cada indivíduo numerados de 1 a 8 e cada tubo recebeu 100µl de sangue total e um determinado estímulo conforme Tabela12 abaixo.

Tabela 12 - Preparação dos tubos para fagocitose e morte intracelular de bactérias *Staphylococcus aureus* com ou sem opsonização

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Sangue	100µl	0	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Bactéria Marcado c/FITC	X	100µl	X	X	X	X	X	X
Bacterias s/opsonizar	X	X	50µl	X	X	X	X	X
Bacterias opsonizadas com soro AB	X	X	X	50µl	X	X	X	X
Bacterias opsonizadas com soro autólogo	X	X	X	X	50µl	X	X	X
Bacterias s/opsonizar	X	X	X	X	X	50µl	X	X
Bacterias opsonizadas com soro AB	X	X	X	X	X	X	50µl	X
Bacterias opsonizadas com soro autólogo	X	X	X	X	X	X	X	50µl
Iodeto de propídeo	X	X	X	X	X	200µL	200µL	200µL

* Volume em µL

1 – controle negativo somente com células; 2 – controle com bactérias sem células; 3 – controle com células e bactérias sem opsonização; 4 – fagocitose com bactérias opsonizadas com soro AB e sem brometo de etídeo; 5 – fagocitose com bactérias opsonizadas com soro autólogo sem brometo de etídeo; 6 – controle com células e bactérias sem opsonização com iodeto de propídeo; 7 – fagocitose com bactérias opsonizadas com soro AB e com iodeto de propídeo; 8 – fagocitose com bactérias opsonizadas com soro autólogo e com iodeto de propídeo.

O tubo 1, sem estímulo, foi posto em banho de gelo até o momento da lise das hemácias. Os tubos restantes que receberam bactérias sem opsonização, bactérias com soro AB e bactérias com soro autólogo, somente células e apenas bactérias com ou sem iodeto de propídeo, foram incubados por 2 horas e 30 minutos, em banho-maria (37°C), sob agitação contínua. Após este período, adicionou-se 2 ml de tampão PBS para retirada de bactérias não fagocitadas, centrifugando por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 3ml de tampão de lise, foram incubadas por

20 minutos e após a incubação, centrifugadas e lavadas novamente por 2 vezes em tampão PBS. As células foram, então, lisadas por choque hipotônico pH 11 e, após, utilizou-se 1 ml de dnase para que não houvesse marcação inespecífica de restos de DNA de células mortas e bactérias mortas. As amostras foram incubadas por 5 minutos em banho-maria. A seguir, foram lavadas novamente e ressuspensas em 200µl de iodeto de propídeo e PBS e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz. As amostras foram novamente lavadas em PBS e após o descarte do sobrenadante, os tubos foram completados com PBS para um volume final de 1 mL e leitura no citômetro de fluxo. A fluorescência emitida foi colhida em escala logarítmica de patógenos mortos marcados com iodeto de propídeo foi medida em $585 \pm 42\text{nm}$ (para o Coulter) e $607 \pm 50\text{nm}$ (para o Guava) detector de FL2. A aquisição e discriminação das subpopulações celulares foram realizadas através de parâmetros de desvio angular a 90° (SSC), granulosidade e da dispersão da luz emitida e intensidade de fluorescência para FL1 e FL2 no tamanho granular (FSC). Tanto FSC como SSC foram calibrados para avaliar populações heterogêneas de células presentes nas amostras, para que não houvesse interferência de patógenos livres e 525 e restos celulares (debris) para isto empregamos uma tensão de 100-200V para FSC.

3.B.g Avaliação da morte Intracelular de Fungos *Candida albicans*

Opsonização dos Fungos

A opsonização dos fungos foi feita com soro AB (controle positivo) e com soro autólogo, como descrito a seguir. Fungos previamente marcados com Fitc, na concentração de 5×10^6 cels/mL, foram incubados com 10% de soro AB ou soro autólogo, em banho maria (37°C) por 30 minutos, sob agitação contínua. Após, os fungos foram lavados em tampão PBS por 2 vezes e ressuspensos ao volume inicial de cada tubo.

Morte Intracelular

Para o ensaio de morte intracelular, foram utilizados 5 ml de sangue de cada indivíduo, colhidos em tubos estéreis contendo heparina sódica. O ensaio iniciou-se com a marcação dos tubos de poliestireno totalizando um total de 8 tubos para cada indivíduo numerados de 1 a 8, sendo que cada tubo recebeu um determinado estímulo conforme na Tabela 13.

Tabela 13 - Preparação dos tubos para fagocitose e morte intracelular com ou sem opsonização de fungos.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Sangue	100µl	0	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Fungo Marcado c/FITC	X	100µl	X	X	X	X	X	X
Fungos s/opsonizar	X	X	50µl	X	X	X	X	X
Fungos opsonizados com soro AB	X	X	X	50µl	X	X	X	X
Fungos opsonizados com soro autólogo	X	X	X	X	50µl	X	X	X
Fungos s/opsonizar	X	X	X	X	X	50µl	X	X
Fungos opsonizados com soro AB	X	X	X	X	X	X	50µl	X
Fungos opsonizados com soro autólogo	X	X	X	X	X	X	X	50µl
Iodeto de propídeo	X	X	X	X	X	200µL	200µL	200µL

* Volume em µL

1 – controle negativo somente com células; 2 – controle com fungos sem células; 3 – controle com células e fungos sem opsonização; 4 – fagocitose com fungo opsonizado com soro AB e sem brometo de etídeo; 5 – fagocitose com fungo opsonizado com soro autólogo sem brometo de etídeo; 6 – controle com células e fungos sem opsonização com iodeto de propídeo; 7 – fagocitose com fungo opsonizado com soro AB e com iodeto de propídeo; 8 – fagocitose com fungo opsonizado com soro autólogo e com iodeto de propídeo.

O tubo 1, sem estímulo, foi posto em banho de gelo até o momento da lise das hemácias. Os tubos restantes que receberam fungos sem opsonização, fungos com soro AB e fungos com soro autólogo, respectivamente, e um outro tubo contendo apenas fungo, foram incubados por 2 horas e 30 minutos, em banho- maria (37°C) sob agitação contínua. Após este período, adicionou-se 2 ml de tampão PBS para retirada de fungos não fagocitados, centrifugando-se por 5 minutos, a 2000 rpm. Em seguida, as células foram ressuspensas em 3ml de tampão de lise, foram

incubadas por 20 minutos e após a incubação foram centrifugadas e lavadas novamente por 2 vezes em tampão PBS. As células foram, então, lisadas por choque hipotônico pH11, lavadas e utilizou-se 1 ml de Dnase para que não houvesse marcação inespecífica de restos de DNA de fungos mortos e células mortas; e foram incubadas por 5 minutos em banho-maria. Novamente, procedeu-se a lavagem ressuspendendo em 200µl de iodeto de propídeo e PBS e incubando por 30 minutos em temperatura ambiente protegidos da luz. A seguir, as amostras foram lavadas novamente em PBS, e após o descarte do sobrenadante, completou-se os tubos com PBS para um volume final de 1 mL e leitura no citômetro de fluxo como foi descrito para a morte intracelular de bactérias.

3.B.h Avaliação de CH 50 E AP50

Com a finalidade de excluir defeitos de opsonofagocitose por comprometimento da imunidade mediada por complemento, as amostras de sangue dos pacientes foram avaliadas para integridade do sistema complemento. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências 56 (LIM 56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, utilizando-se o soro obtido pela coleta em tubo seco. Ensaio hemolítico para avaliação das vias clássica (CH50) e alternativa (AP50) foram realizados nas amostras estocadas, de acordo com Waage et al 1996 e Joiner et al, 1983, respectivamente. Os métodos foram adaptados para placas com microtítulos, como se segue.

A **via clássica** foi avaliada pela técnica de **CH50** (complemento hemolítico 50%), onde as hemácias de carneiro, coletadas em solução Alsever's modificada, foram lavadas em tampão GVBS-Mg e centrifugadas a 3000 rpm, por 5 minutos, à 4^oC. Essa lavagem foi repetida até que não houvesse lise no sobrenadante. Sensibilizou-se uma suspensão de hemácias a 2% com hemolisina 1/500 e incubou-se em banho-maria à 37^oC, por 30 minutos (SH – sistema hemolítico). Após centrifugação e retirada do sobrenadante, o SH foi ressuspensão no mesmo volume de tampão e armazenado à 4^oC até o momento do uso. Diluíram-se as amostras de soro nas frações de 1/20 a 1/60, em tampão GVBS-Mg e incubou-se com 50 µL do SH em uma placa de 96 poços de fundo redondo.

A curva padrão foi feita paralelamente:

K0 = 50 µL de SH + 150 µL de tampão GVBS-Mg.

K50 = 25 µL de SH + 175 µL de água destilada.

K100 = 50 µL de SH + 150 de água destilada.

A placa foi incubada por 1 hora, a 37^oC, em câmara úmida. Foi então, centrifugada a 1000 rpm, por 3 minutos, à 4^oC; e 50 µL do sobrenadante foram transferidos para uma outra placa de 96 poços de fundo chato contendo 200 µL de água destilada. A leitura da absorbância foi determinada a 414 nm. O resultado (número de unidades – U – de CH50) é a recíproca da diluição do soro que causou 50% da hemólise. O valor de referência de CH50 em nosso laboratório varia de 63 a 170 U/mL.

Para a avaliação da **via alternativa** (AP50), eritrócitos de coelho foram lavados em GVBS-Mg-EGTA (VBS contendo 0,1% de gelatina, 10mM $MgCl^{+2}$ e 10mM EGTA) por 5 minutos a 2500 rpm a 4°C, até a inibição total da lise espontânea. Foi feita uma suspensão com 2% dos eritrócitos e estocado a 4°C até o uso ou por 4 dias. As amostras foram diluídas (1/10 até 1/80) em GVBS-Mg-EGTA no gelo e 150µL foram transferidos para orifícios de uma microplaca com fundo redondo e 50µL de eritrócitos foram adicionados em cada diluição. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos e 50µL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca com fundo chato com 200µL de água destilada. A hemólise pelas proteínas do complemento foi determinada pela leitura com uma absorbância de 414nm em um leitor de microplaca. As absorbâncias foram colocadas em um gráfico e os resultados foram expressos em U/mL. O padrão de normalidade estabelecido em nosso laboratório foi de 16-36 U/mL para via alternativa.

3.C Análise Estatística

A análise estatística foi feita com:

- Estatística descritiva, com o cálculo da média, mediana e desvio padrão para cada variável estudada.
- Estatística inferencial, com a aplicação do teste de Kolmogorov- Smirnov para verificar normalidade dos dados.

- Para dados paramétricos, teste t de Student para dois grupos não pareados, teste exato de Fisher para verificar associação entre duas variáveis qualitativas e coeficiente de correlação linear de Pearson entre pares de variáveis quantitativas.
- Para dados não paramétricos, teste de Mann-Whitney para comparação de medianas e coeficiente de correlação de Spearman entre pares de variáveis quantitativas.

Programa utilizado GraphPad Prism versão 5.01

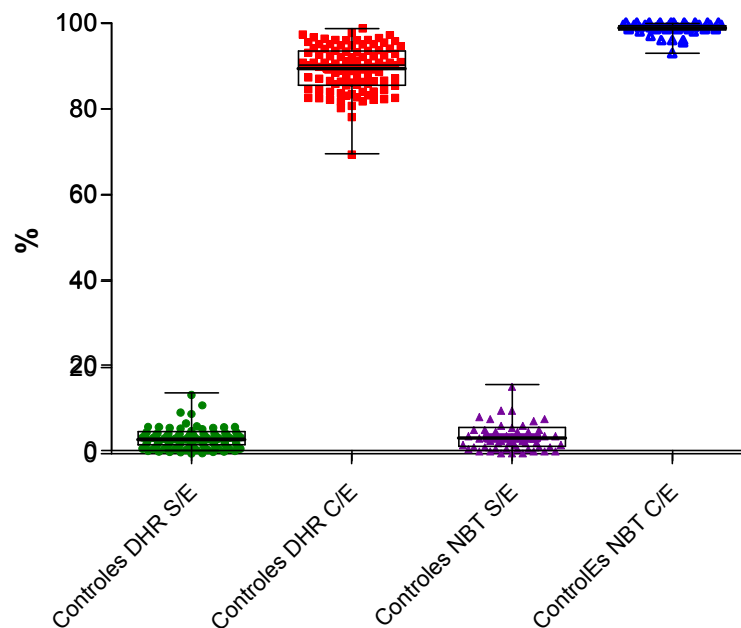
O nível de significância adotado foi de 5% (0,05).

4 RESULTADOS

4.A Avaliação do burst oxidativo: Testes do NBT e DHR

Foram realizados 101 testes de DHR em voluntários sadios e 50 exames do NBT, estabelecendo valores $\geq 80\%$ como normais para células estimuladas com PMA e menor ou igual a 15% para os valores de células sem estímulo.(Figura15)

Figura 15 - Teste da Dihidrorodamina (DHR)(n=101) e do Azul de Nitrotetrazolio (NBT)(n=50) em indivíduos sadios. (Anexo)



O teste de Dihidrorodamina foi avaliado em indivíduos sadios (n=6) e em amostras de sangue de pacientes suspeitos de distúrbios

de fagócitos (n= 7) no dia da coleta e após 24 horas, com armazenamento adequado (Tabela 14).

Tabela 14 - Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em amostras de indivíduos sadios no tempo 0 e após 24 horas da coleta de sangue.

	0 hora	24 horas
1	92,05	96,25
2	86,35	96,05
3	89,3	93,5
4	96,25	87,4
5	92,15	93,05
6	87,4	95

Com a finalidade de avaliar o efeito do transporte em relação ao resultado do teste, foram repetidas amostras de 24 horas de pacientes procedentes de outras localidades (Tabela 15).

Tabela 15 - Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em amostras de pacientes encaminhados de outros serviços (n=7) no tempo 0 e após 24 horas da coleta de sangue.

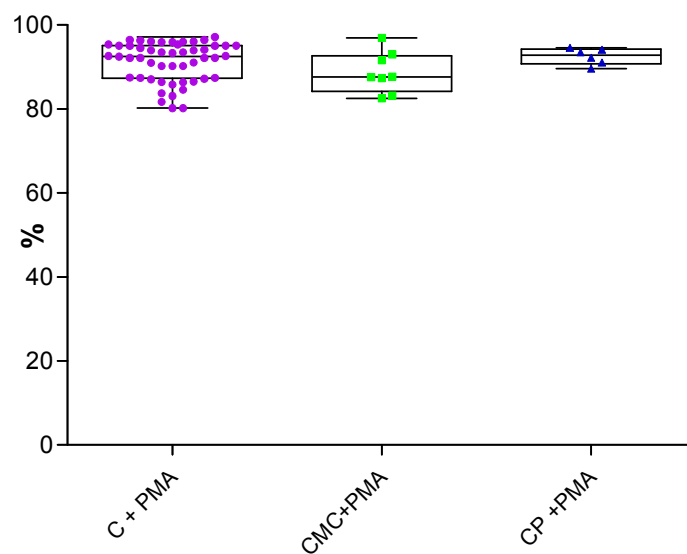
horas	sem estímulo		com estímulo	
	0	24	0	24
1	1,32	3,53	89,9	91,95
2	1,34	4,99	89,95	93,6
3	4,45	0,46	93,75	94,215
4	1,63	2,52	95,945	94,075
5	7,88	15,98	96,305	93,765
6	16,11	14,98	93,55	82,6
7	15,15	15	91,1	81,75

Os resultados obtidos pelo índice de fluorescência foram semelhantes aos apresentados em percentual.

O teste do DHR aplicado aos pacientes com CMC e com CP apresentou resultados não significativamente diferentes dos controles.

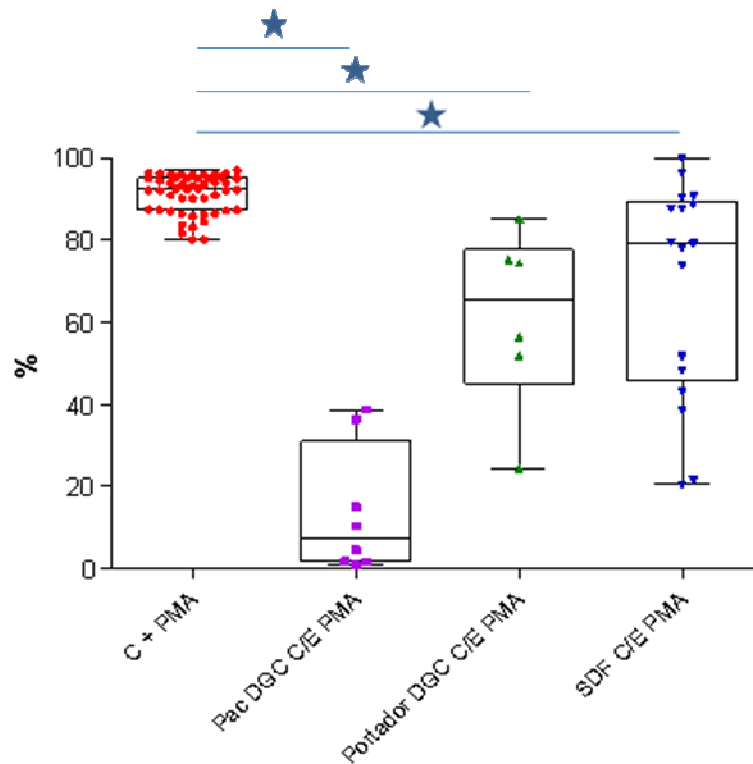
Verificou-se que pacientes com CMC apresentavam valores mais elevados do teste de DHR antes de estimulado com PMA, porém sem significância estatística (Figura 16).Anexo)

Figura 16 - Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em pacientes com Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC) e Candidíase Persistente (CP) em comparação com o grupo controle.



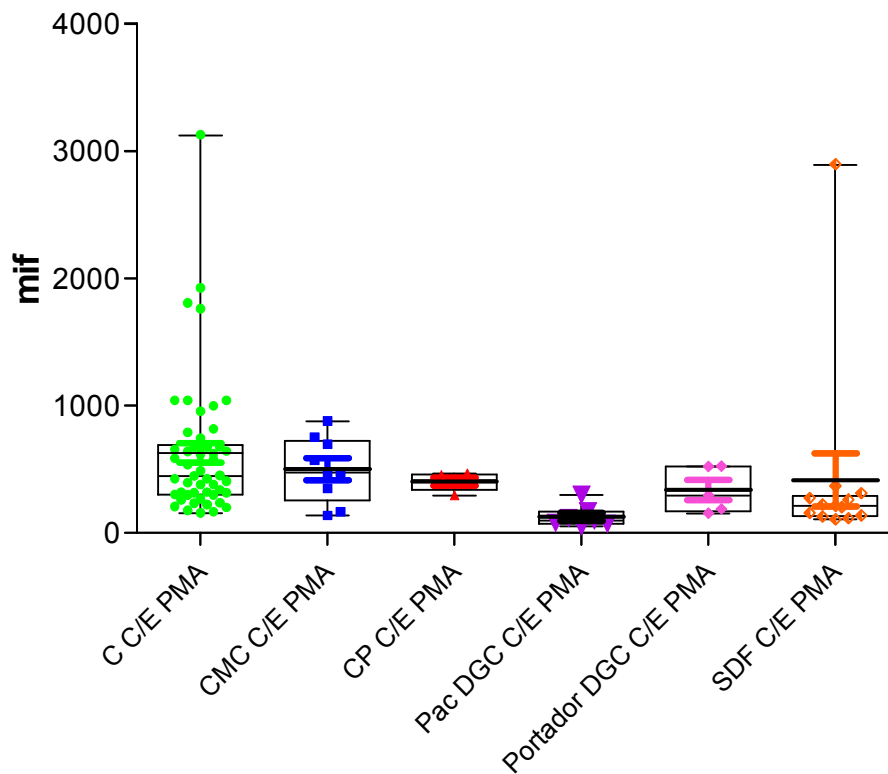
Pacientes com DGC, portadores de DGC e com SDF apresentaram valores significativamente menores de DHR estimulado com PMA comparando-se com o grupo controle, verificando-se $p=0,0001$, $p=0,0005$ e $p=0,0053$, respectivamente (Figura 17).

Figura 17 - Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC), portadores de DGC e com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) em comparação com o grupo controle.



A média da intensidade de fluorescência também foi significativamente menor nos grupos DGC ($p= 0,0001$) e SDF ($p=0,0004$). Todos os resultados foram avaliados com a média de índice de fluorescência (MIF) e em percentual de células estimuladas, verificando-se que o primeiro parâmetro (MIF) mostrou-se com grande variabilidade não distinguindo os controles de outros pacientes, exceto pelos pacientes com DGC e SDF (Figura 18).

Figura 18 - Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em pacientes com Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC), Candidíase Persistente (CP), Doença Granulomatosa Crônica (DGC), portadores de DGC e com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) em comparação com o grupo controle, expressos em Média de índice de Fluorescência (mif).



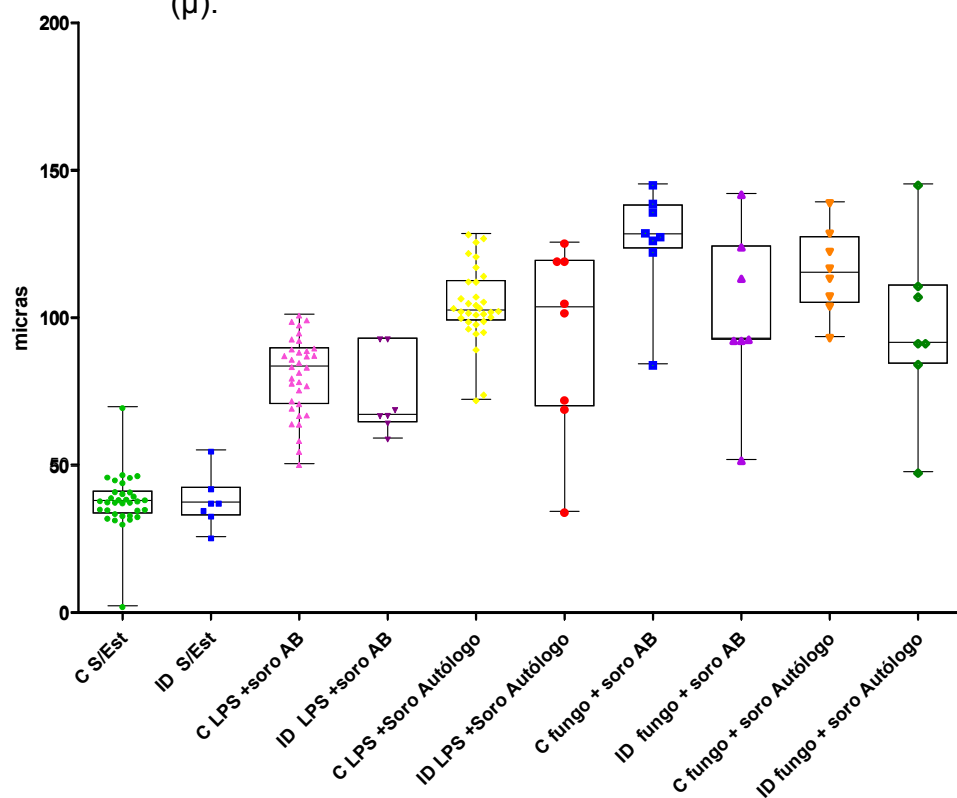
4.B Avaliação da capacidade quimiotática

A técnica de quimiotaxia (Boyden modificada) foi estimulada com lipopolissacáride (LPS de *E.coli*) em 24 controles e com fungos vivos *C.albicans* em 8 indivíduos saudáveis.

Em relação ao grupo de pacientes com Suspeita de Deficiência de Fagócitos (SDF) (n=5), não houve diferença estatisticamente

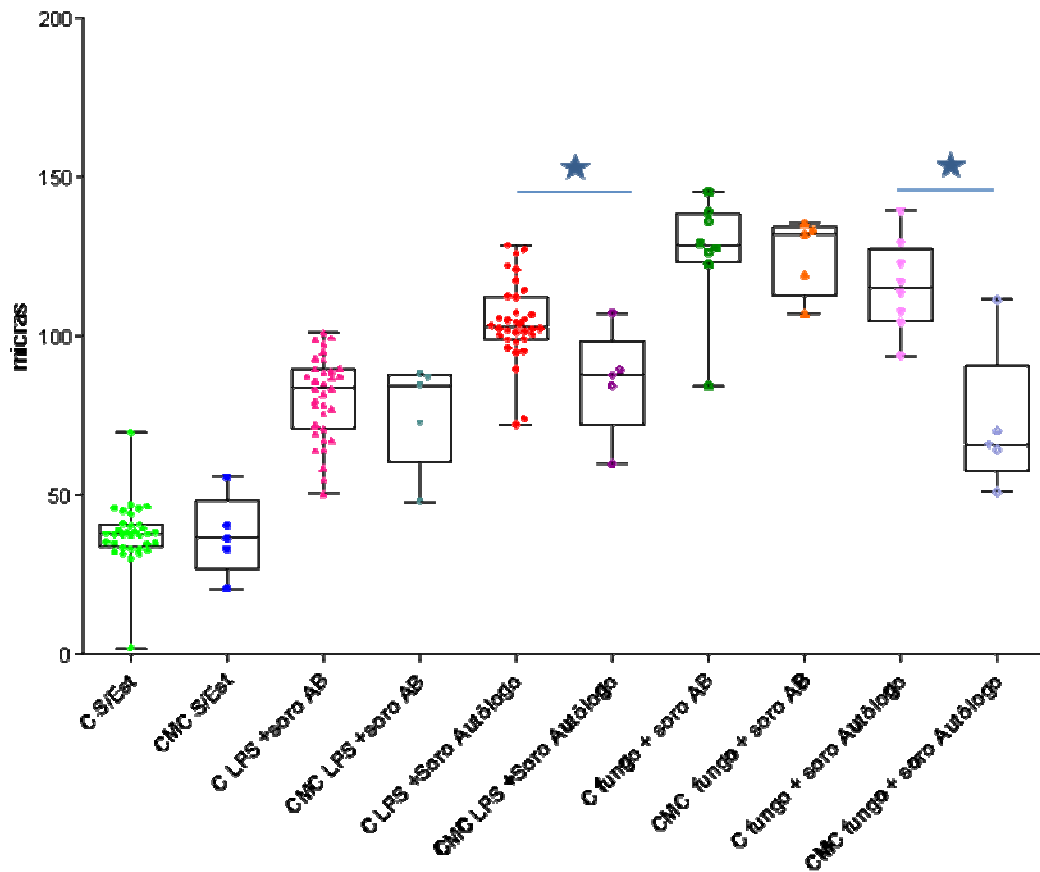
significativa ao se analisar os estímulos em separado, porém, houve tendência a menor resposta quimiotática nas células de pacientes estimuladas por fungos com soros AB e autólogo. Ao avaliar todos os estímulos quimiotáticos, verificou-se $p=0,0001$ (Figura 19).

Figura 19 - Quimiotaxia de pacientes com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) (n=5) em comparação com o grupo controle (μ).



A quimiotaxia avaliou pacientes com CMC (n=7) utilizando-se estimulação com LPS e Candida. Observou-se menor resposta quimiotática ao se estimular com soro autólogo tanto com LPS ($p= 0,0246$) como por fungos ($0,0109$) (Figura 20). A estimulação com soro AB e LPS ou fungos não apresentou diferença estatisticamente significativa comparando-se com o grupo controle.

Figura 20 - Quimiotaxia de pacientes com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) (n=5) em comparação com o grupo controle (μ).



4.C Fagocitose e Aderência de bactérias inativadas

O ensaio de fagocitose e aderência de Bactérias *S. aureus* foi padronizado em voluntários sadios (n=5), aplicado em pacientes com CMC (n=3) e CP (n=5). Pacientes com CMC apresentaram redução significativa na resposta fagocitária em percentual quando estimulados com soro autólogo ($p = 0,0357$) e este resultado não se mostrou significativo ao se utilizar a média de índice de fluorescência (mif) (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Percentual de Fagocitose de Bactérias inativadas sem opsonização, opsonizadas com soro AB e opsonizadas com soro autólogo em controle, pacientes com CMC e CP.

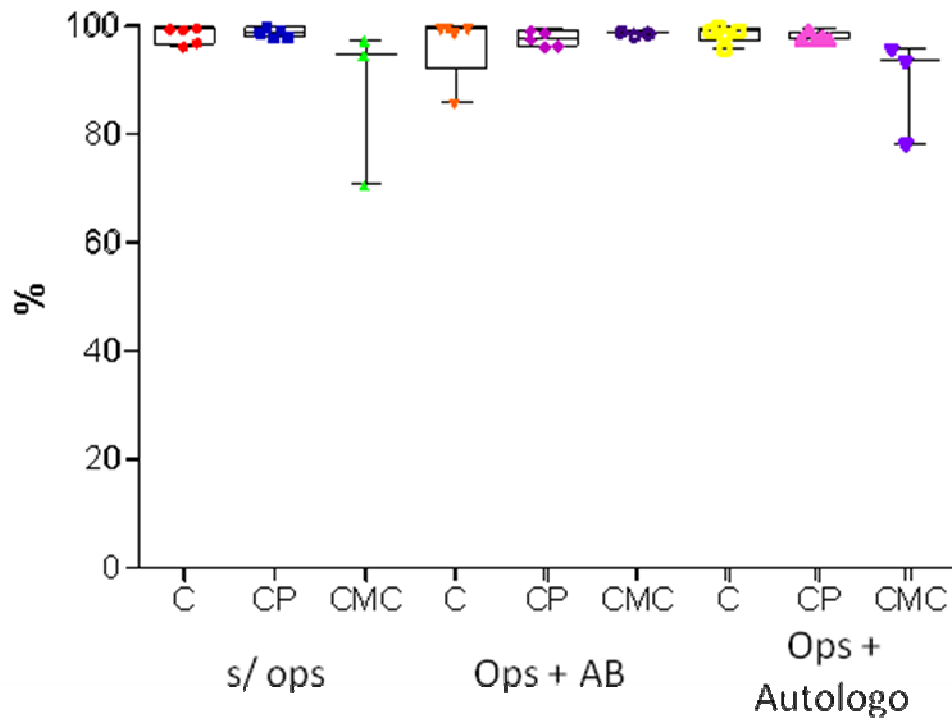
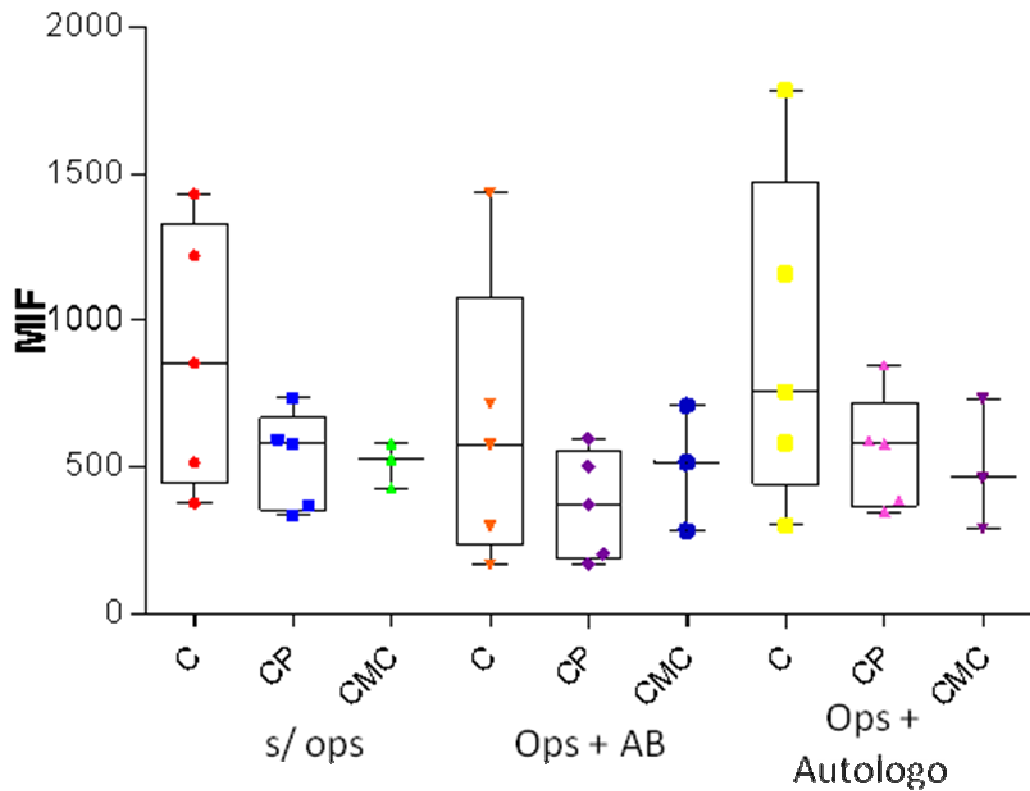
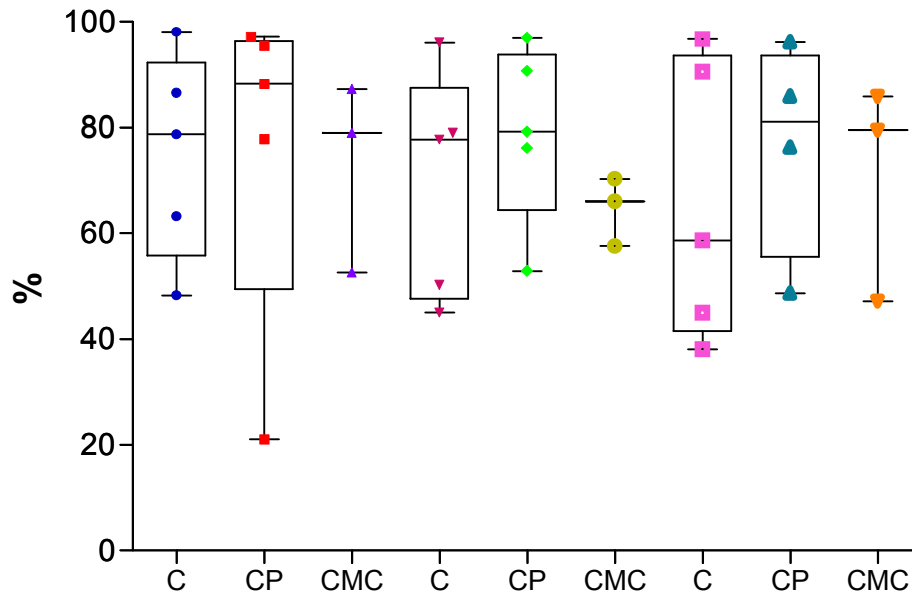


Figura 22 - Média de Índice de Fluorescência da Fagocitose de Bactérias inativadas sem opsonização, opsonizadas com soro AB e opsonizadas com soro autólogo



Não houve diferença estatisticamente significativa na aderência de bactéria inativadas ao se avaliar o grupo controle em comparação com os grupos CMC e CP (Figura 23).

Figura 23 - Percentual de Aderência de Bactérias inativadas sem opsonização, opsonizadas com soro AB e opsonizadas com soro autólogo em controles e pacientes com CMC e CP.



4.D Fagocitose e Aderência de fungos *Candida* inativados

O ensaio de fagocitose e aderência de fungos *Candida albicans* foi padronizado em voluntários sadios (n=7), aplicado em pacientes com CMC (n=5) e CP (n=4). Não houve diferença estatisticamente significativa na resposta fagocitária sem estímulo, quando estimulados com soro AB ou autólogo tanto em percentual como em média de índice de fluorescência (mif) (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Fagocitose de fungos *Candida albicans* inativados sem opsonização, com opsonização com soro AB e opsonizadas com soro autólogo

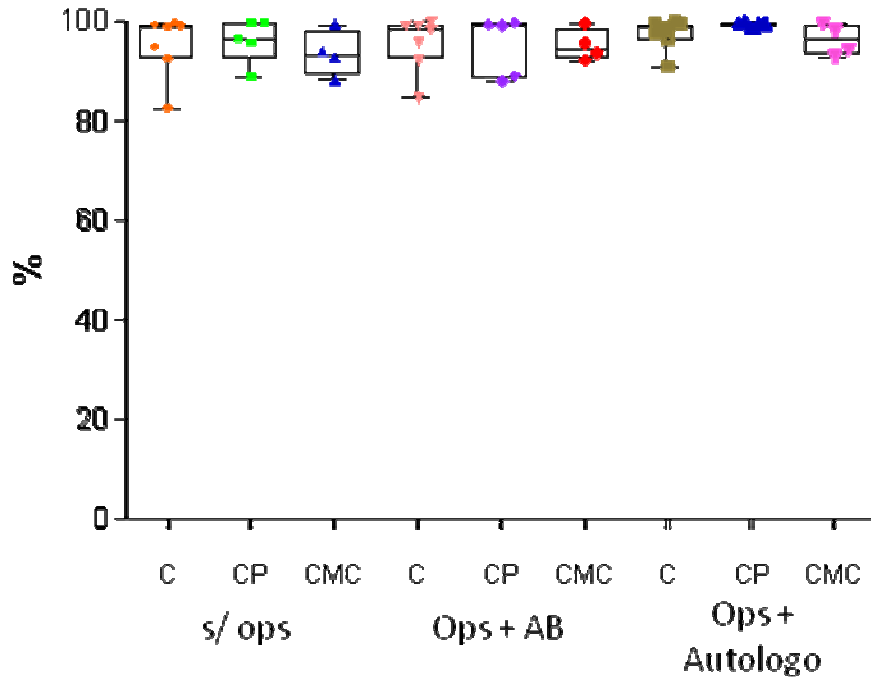
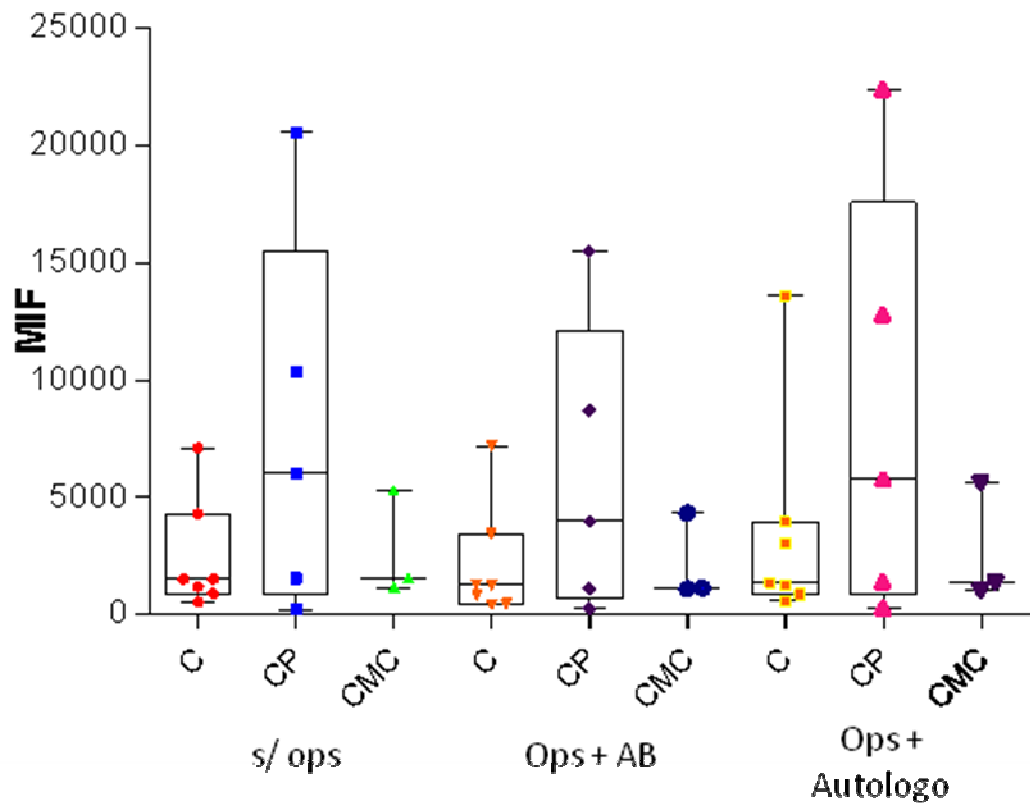


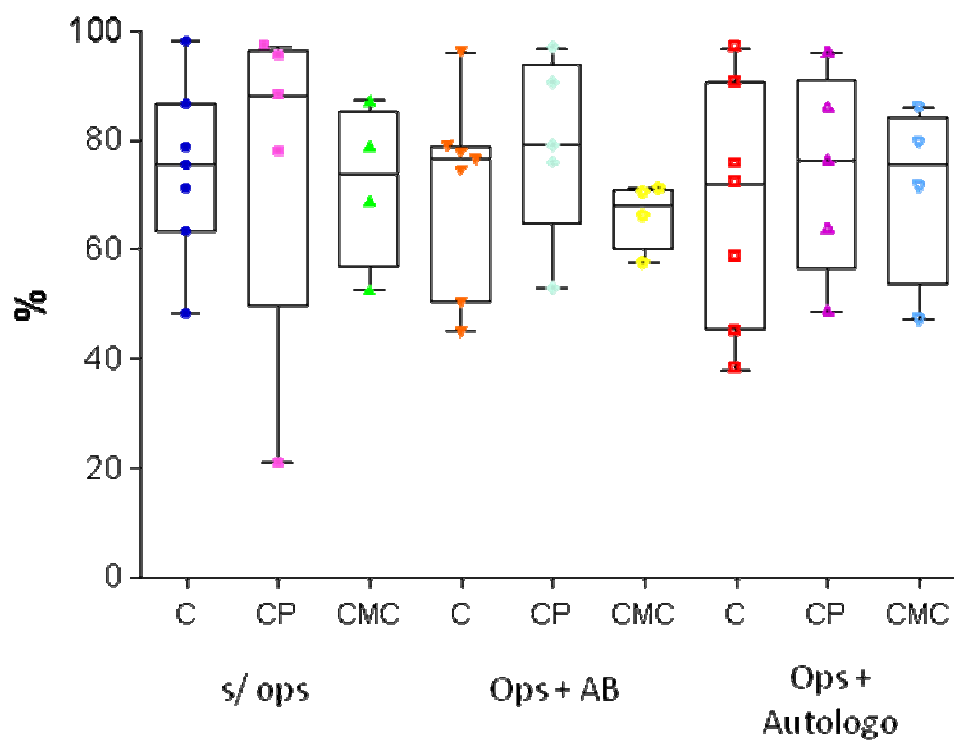
Figura 25 - Média da intensidade de Fluorescência da Fagocitose de fungos *Candida albicans* inativados sem opsonização, opsonizadas com soro AB e opsonizadas com soro autólogo.



Não encontramos diferença significativa quando analisados estes grupos frente a média de intensidade de fluorescência

Não houve diferença estatisticamente significativa na aderência de fungos inativados ao se avaliar o grupo controle em comparação com os grupos CMC e CP (Figura 26).

Figura 26 - Aderência de fungos *Candida albicans* inativados sem opsonização, opsonizados com soro AB e opsonizados com soro autólogo, em percentual.



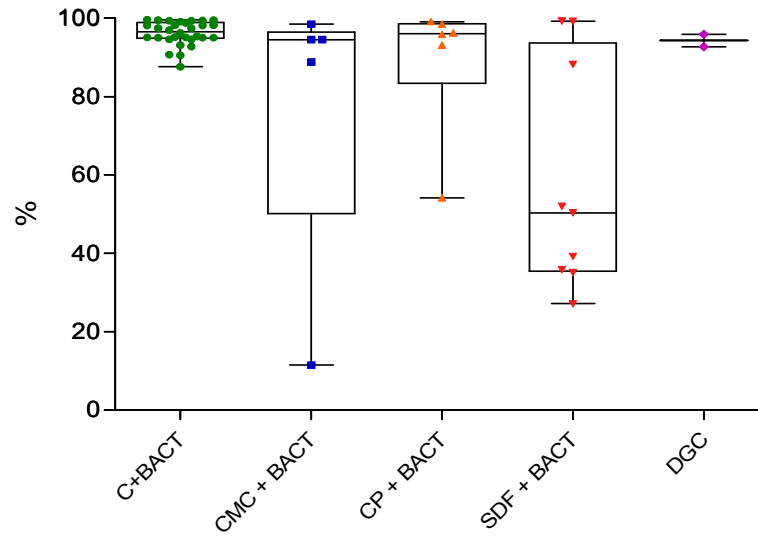
4.E Fagocitose e Morte Intracelular de bactérias *S. aureus*

A padronização da opsonofagocitose foi feita verificando-se a marcação de granulócitos por anticorpos monoclonais CD15. Foram avaliados os seguintes grupos:

Grupo	N
Controle	18
CMC	5
CP	6
Suspeita de Dist. de fagócitos	9
DGC	2

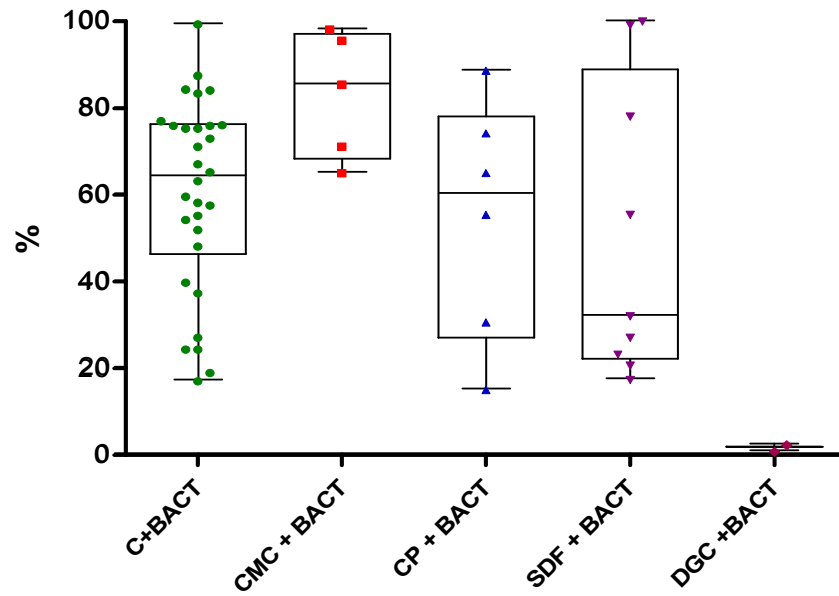
Houve diferença estatisticamente significativa para o grupo de pacientes suspeitos de deficiência de fagócitos ($p= 0,0044$) em comparação com o grupo controle. Não houve diferença significativa nos outros grupos. Um dos pacientes com CMC apresentou valores baixos para fagocitose de bactérias (Figura 27).

Figura 27 - Fagocitose de bactérias sem opsonização do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.



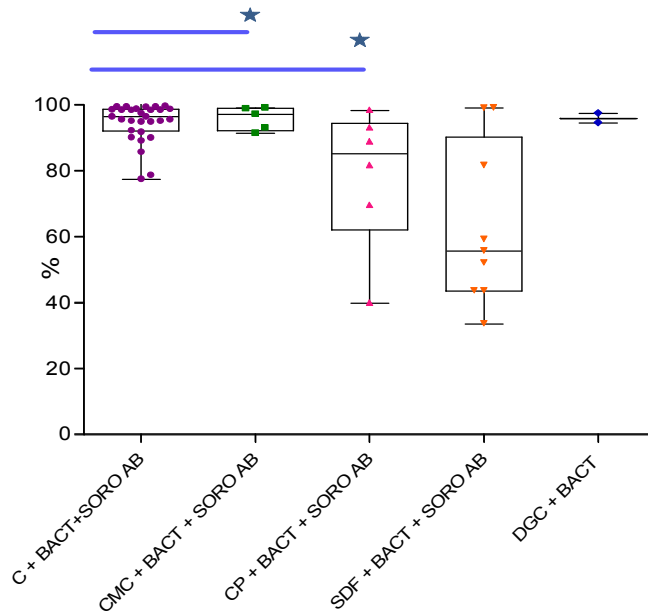
Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupo controle e com CMC na morte intracelular de bactérias sem opsonização ($p=0,0403$) (Figura 28).

Figura 28 - Morte Intracelular de bactérias sem opsonizar do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.



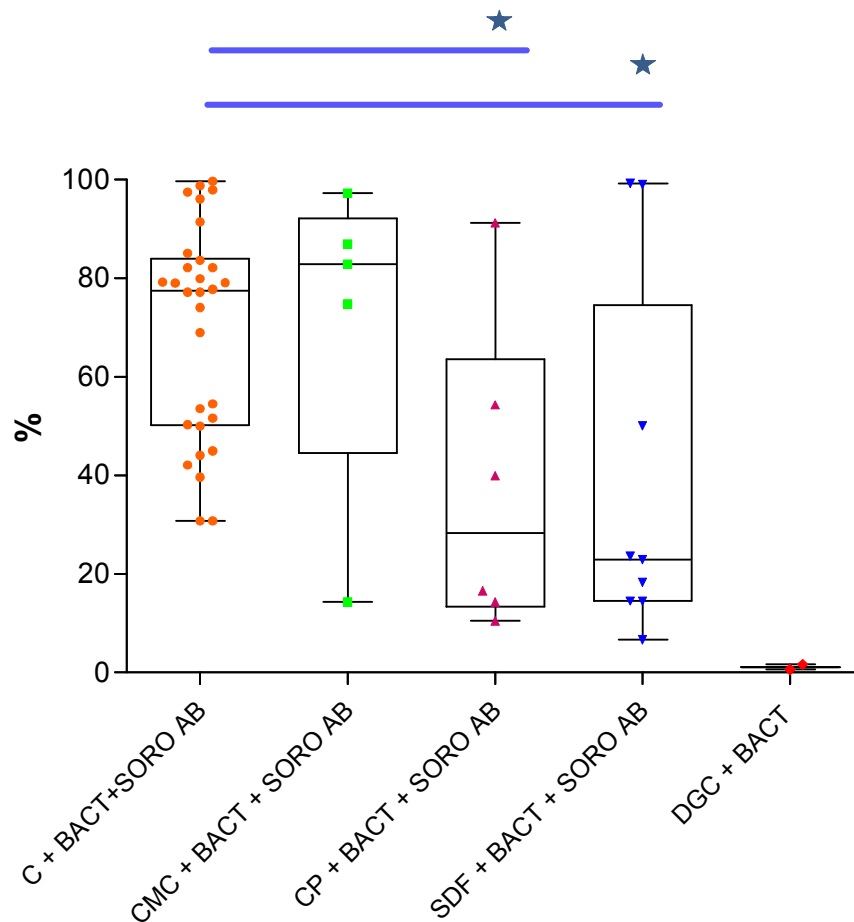
A avaliação da fagocitose de bactérias opsonizadas com soro AB mostrou-se diferente estatisticamente ao se comparar o controle com o grupo CP ($p=0,0129$) e com o grupo SDF ($p= 0,0048$) (Figura 29).

Figura 29 - Fagocitose de bactérias opsonizadas com soro AB do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.



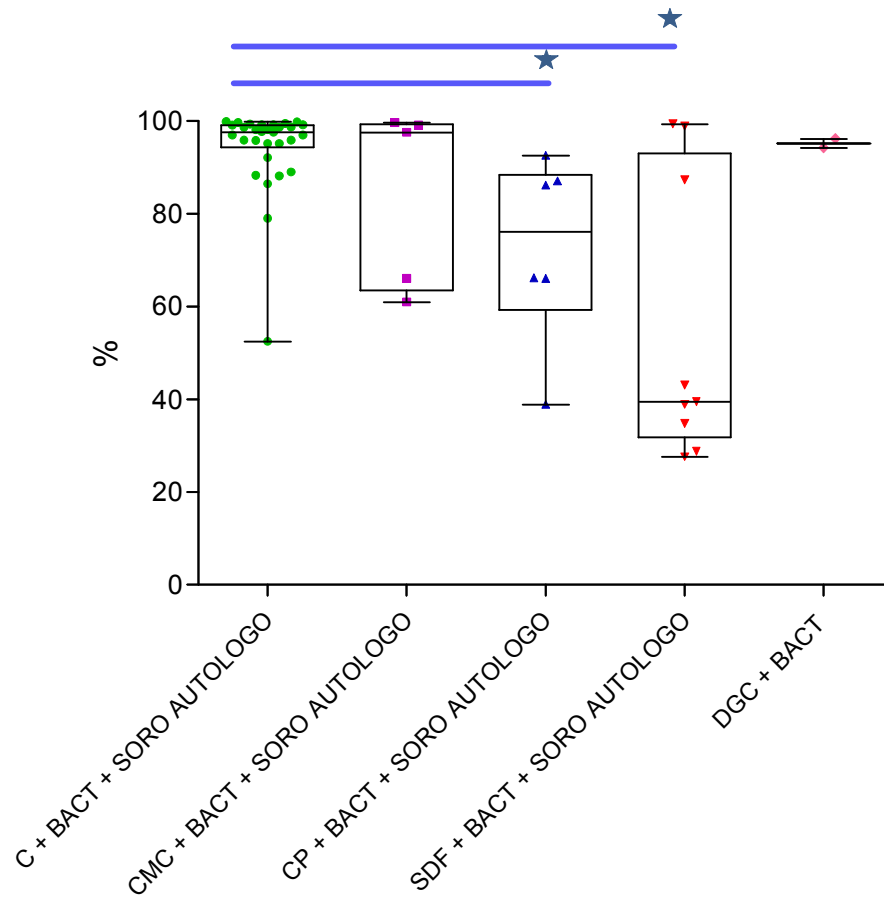
A morte intracelular de bactérias opsonizadas com soro AB foi significativamente menor nos grupos de CP ($p=0,0258$) e SDF ($p=0,0205$) em comparação com o grupo controle (Figura 30).

Figura 30 - Morte Intracelular de bactérias opsonizadas com soro AB do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.



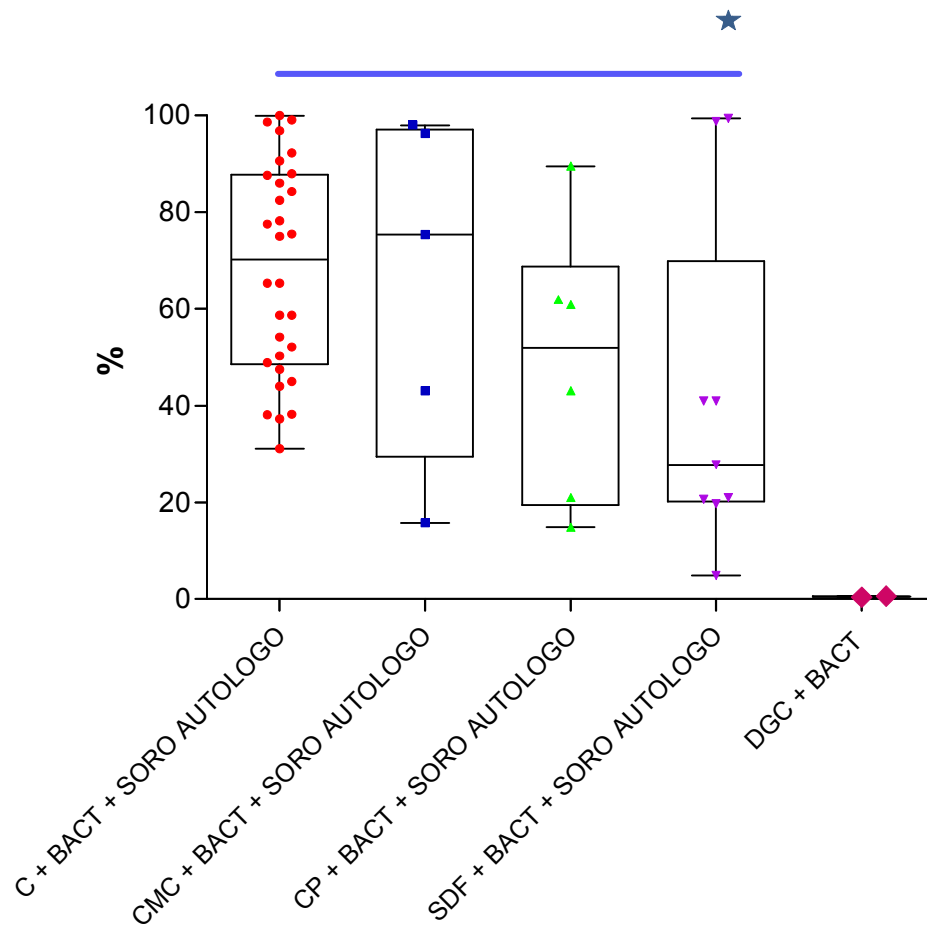
Na fagocitose de bactérias opsonizadas com soro autólogo, houve diferença significativa quando comparados os 4 grupos ($p= 0,0038$), quando comparados os grupos CP ($p= 0,0013$) e SDF ($p= 0,0048$) em relação ao grupo controle (Figura 31).

Figura 31 - Fagocitose de bactérias opsonizadas com soro autólogo do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.



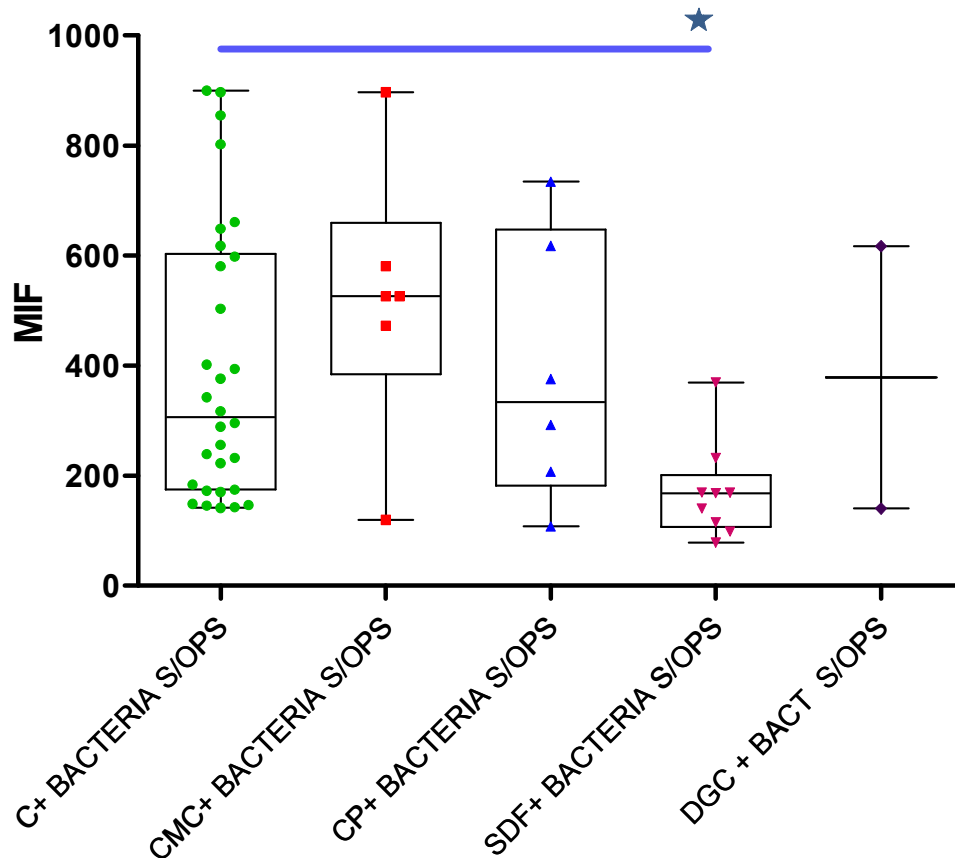
A morte intracelular de bactérias opsonizadas com soro autólogo foi estatisticamente menor no grupo de pacientes com SDF em relação aos controles ($p=0,0205$). A avaliação dos pacientes em relação ao controle do dia verificou redução da capacidade bactericida em um paciente com CMC e dois pacientes com CP.(Figura 32).

Figura 32 - Morte Intracelular de bactérias opsonizadas com soro autólogo do grupo controle e de pacientes com CMC, CP, SDF e DGC.



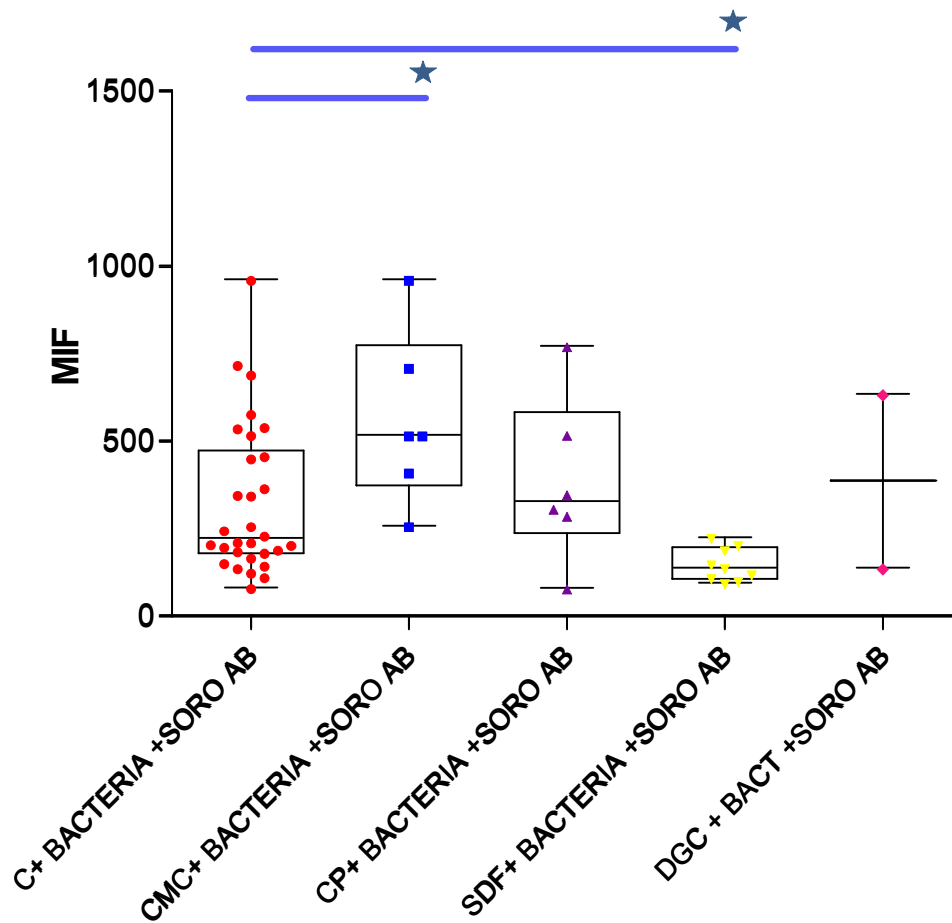
Na avaliação da média de intensidade de fluorescência da capacidade bactericida sem opsonização houve diferença significativa entre os grupos controle e SDF ($p=0,0020$), verificando-se redução nos pacientes (Figura 33).

Figura 33 - Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de bactérias *S.aureus* sem opsonização nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



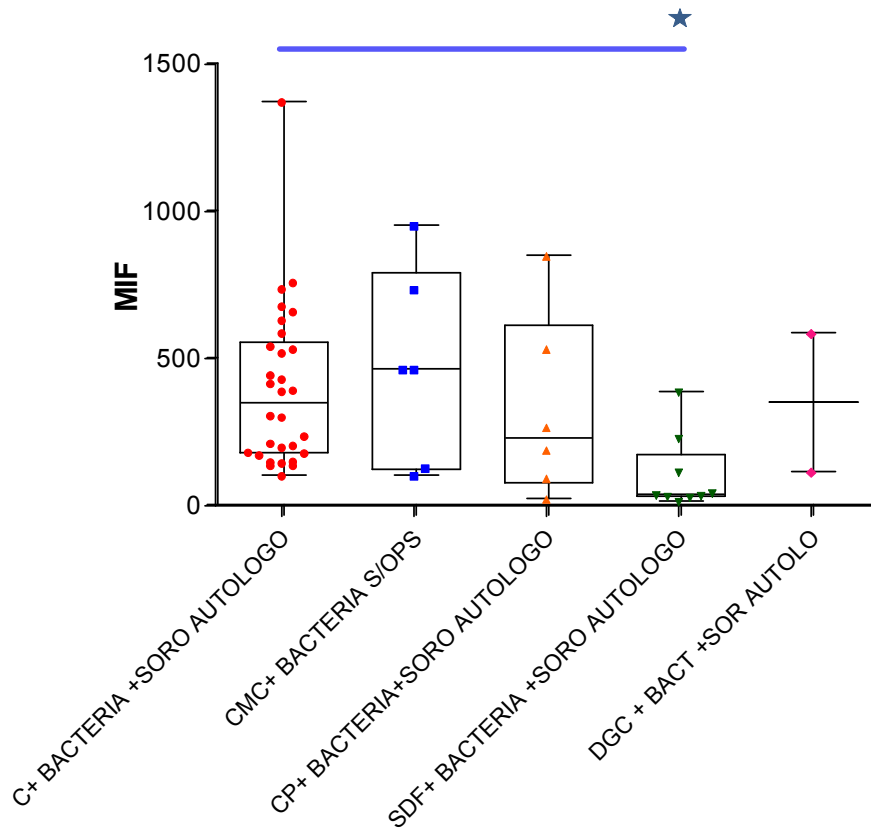
Na avaliação da média de intensidade de fluorescência da capacidade bactericida opsonizando-se com soro AB houve diferença significativa entre os grupos controle e CMC ($p= 0,0304$) e SDF ($p=0,0039$), verificando-se aumento na CMC e redução nos SDF (Figura 34).

Figura 34 - Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de bactérias *S.aureus* opsonizada com soro AB nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



Na avaliação da média de intensidade de fluorescência da capacidade bactericida opsonizando-se com soro autólogo houve diferença significativa entre os grupos controle e SDF ($p=0,0004$), verificando-se redução nos SDF (Figura 35).

Figura 35 - Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de bactérias *S.aureus* opsonizadas com soro autólogo nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC..



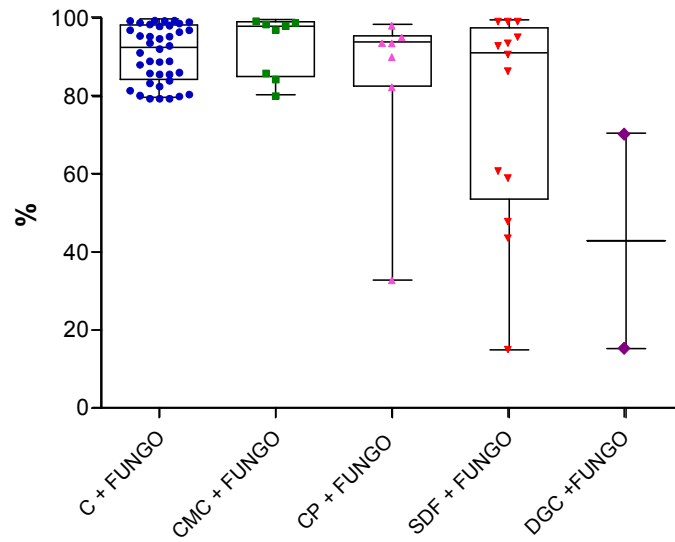
4.F Fagocitose e Morte Intracelular de fungos *Candida albicans*.

Para a padronização do teste de opsonofagocitose de fungos foram realizados experimentos marcando-se com o anticorpo MY-7 (Marcador de granulócitos). Foram avaliados os seguintes grupos:

Grupo	N
Controle	22
CMC	8
CP	7
Suspeita de Dist. de fagócitos	13
DGC	2

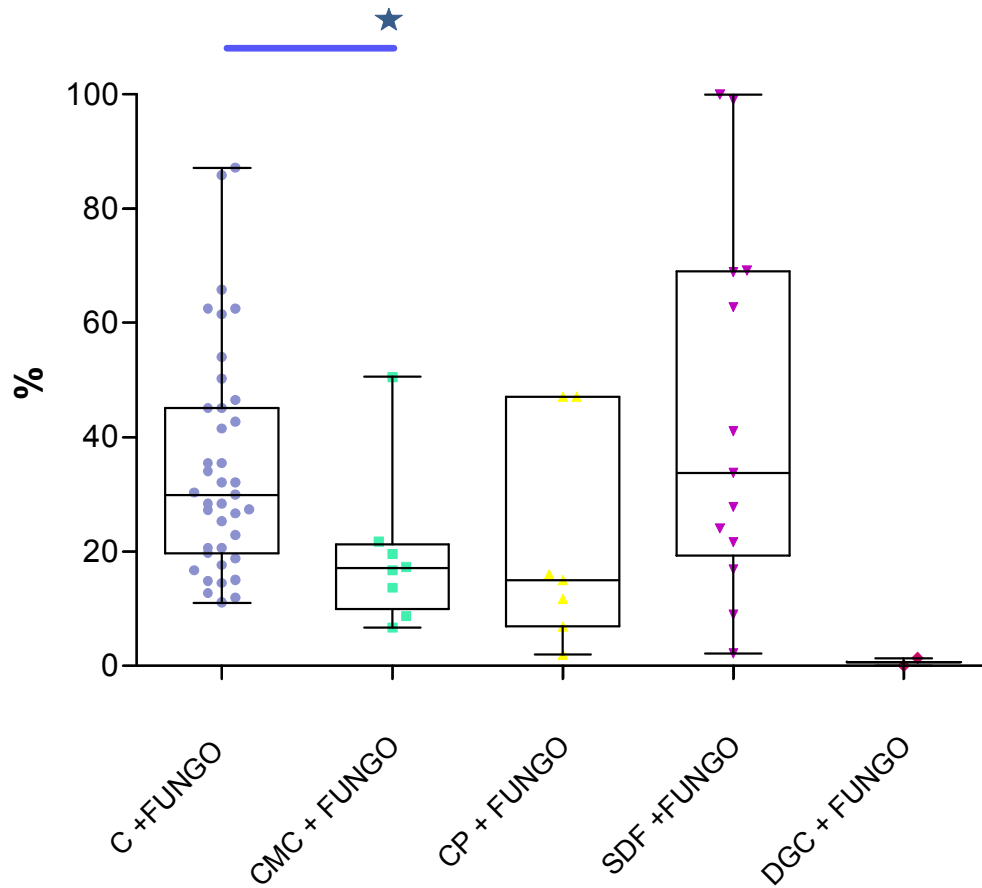
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à fagocitose de fungos não opsonizados. Verificou-se redução deste parâmetro nos pacientes do grupo SDF quando comparados ao controle do dia (Figura 36).

Figura 36 - Fagocitose de fungos sem opsonizar nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



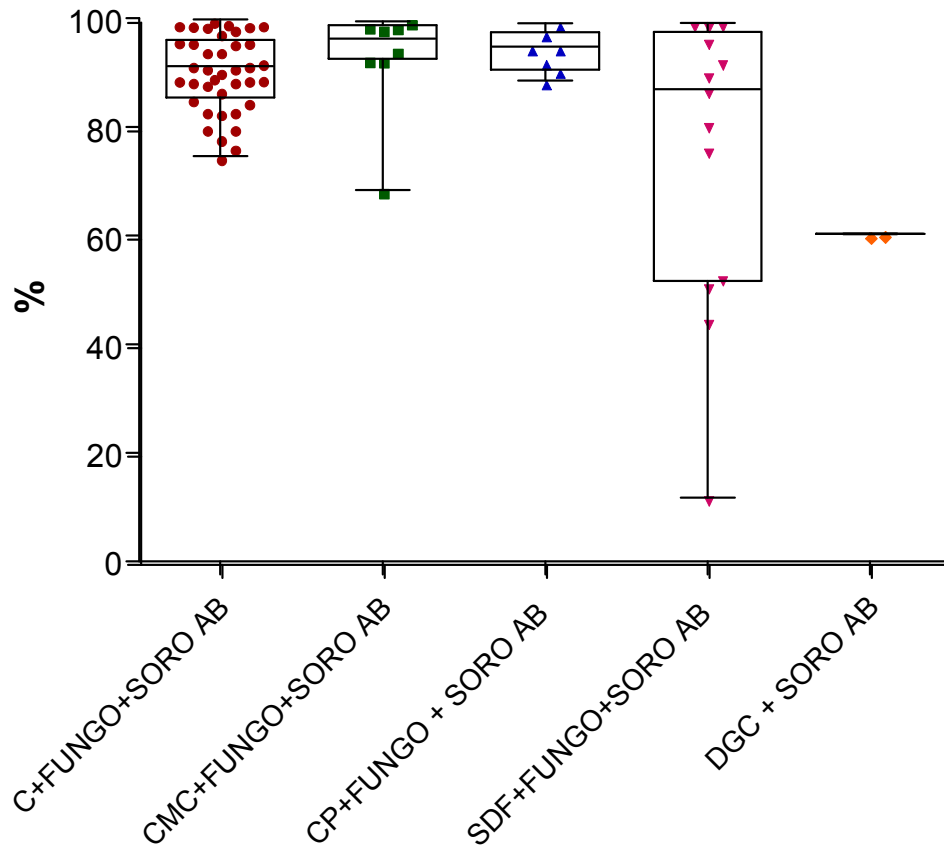
Houve diferença estatisticamente significativa da morte intracelular de fungos sem opsonização entre o grupo controle e de CMC ($P= 0,0155$) e houve diferença significativa ao se comparar os valores de morte intracelular do grupo SDF em relação ao controle do dia (Figura 37)

Figura 37 - Morte intracelular de Fungos sem opsonizar nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



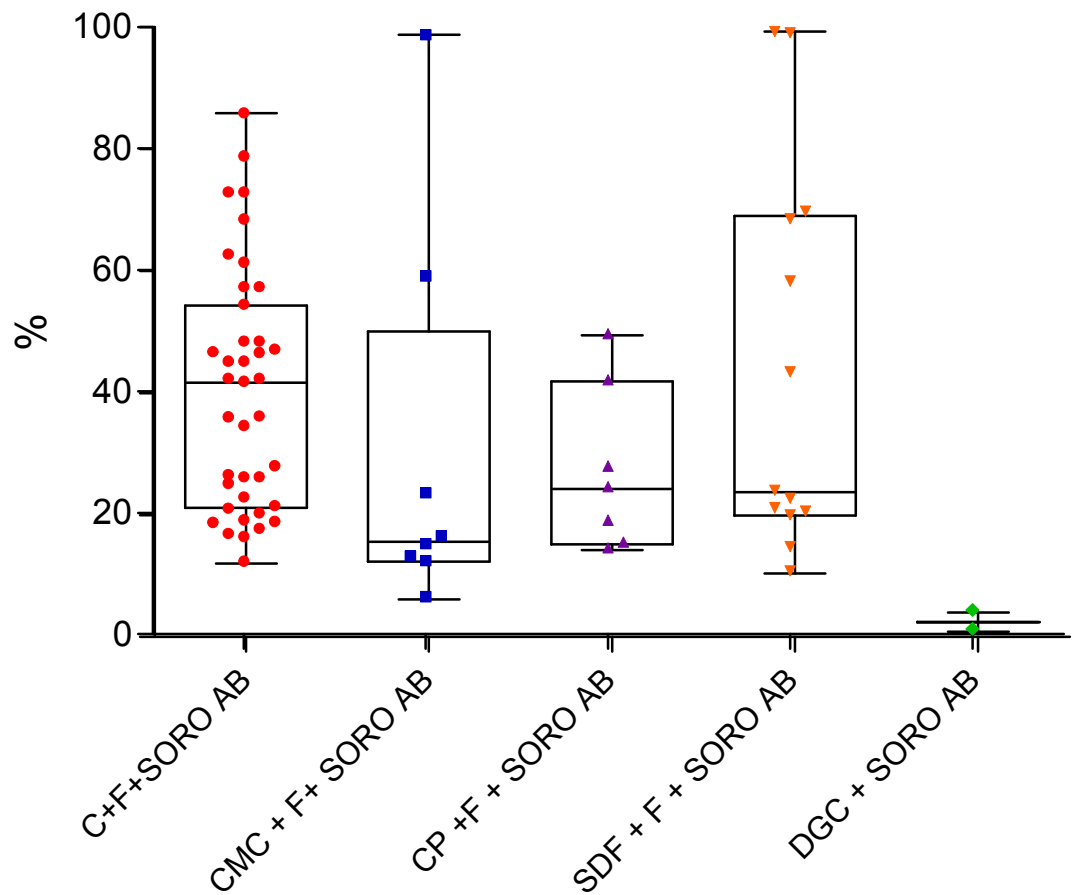
A fagocitose de fungos opsonizados com soro AB não se mostrou estatisticamente significativa entre os grupos, porém, a análise de cada indivíduo com seu controle do dia apresentaram diferença significativa no grupo de SDF e em um paciente com CMC (Figura 38).

Figura 38 - Fagocitose de fungos opsonizados com soro AB nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



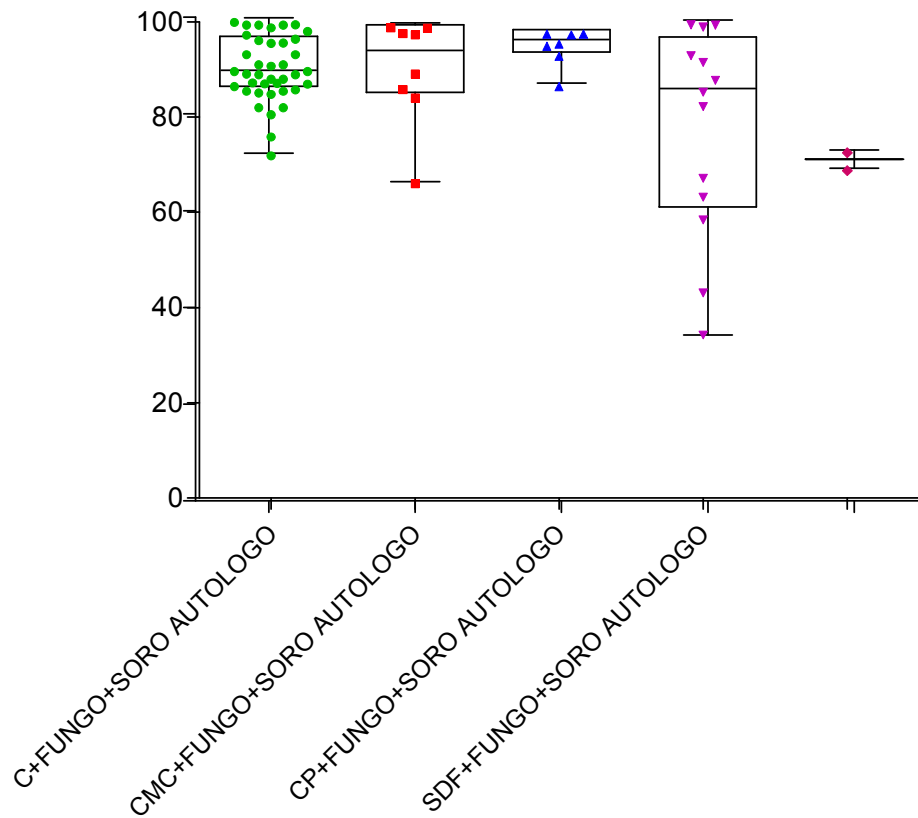
A morte intracelular de fungos opsonizados com soro AB não se mostrou estatisticamente significativa entre os grupos, porém, a análise de cada indivíduo com seu controle do dia verificou diferença significativa no grupo de SDF (Figura 39).

Figura 39 - Morte intracelular de Fungos opsonizados com soro AB nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



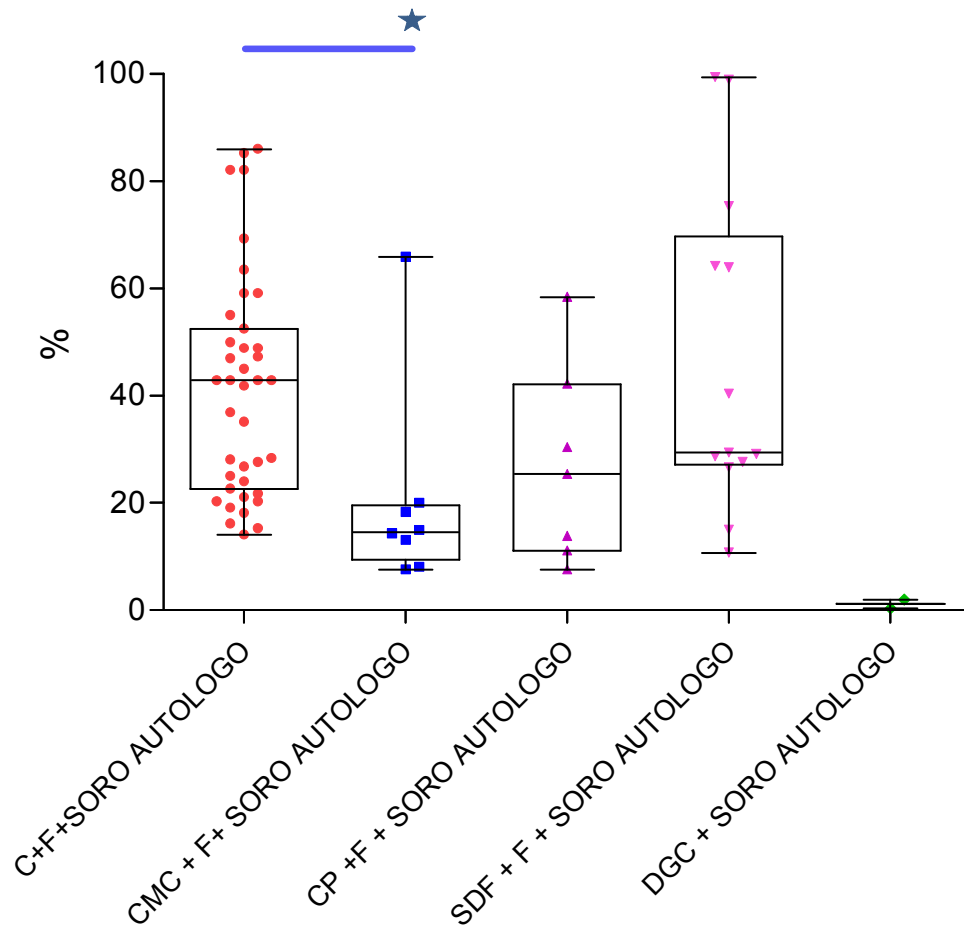
A fagocitose de fungos opsonizados com soro autólogo não se mostrou estatisticamente significativa entre os grupos. A comparação de cada paciente com seu controle do dia verificou diferença significativa no grupo de SDF e em um paciente com CMC (Figura 40).

Figura 40 - Fagocitose da morte intracelular de fungos opsonizados com soro autólogo nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



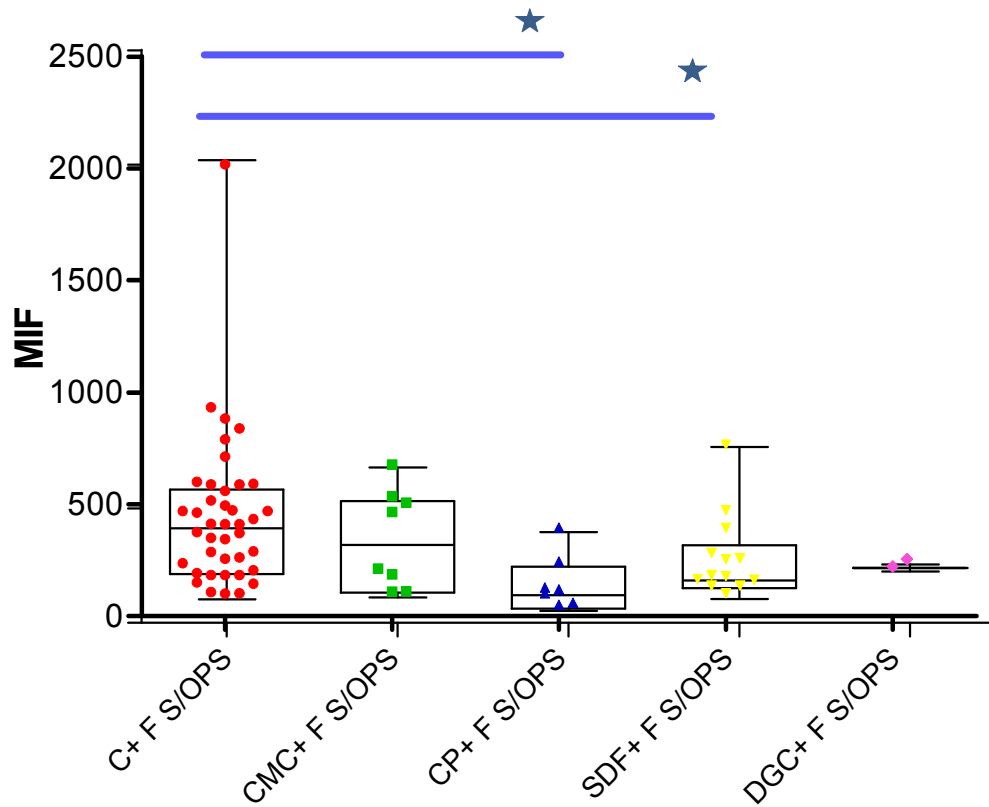
A morte intracelular de fungos opsonizados com soro autólogo verificou diferença estatisticamente significativa no grupo de CMC em comparação com o grupo controle ($p= 0,0018$). A análise de cada indivíduo com seu controle do dia verificou diferença significativa no grupo de SDF (Figura 41).

Figura 41 - Morte intracelular de Fungos opsonizados com soro autólogo nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



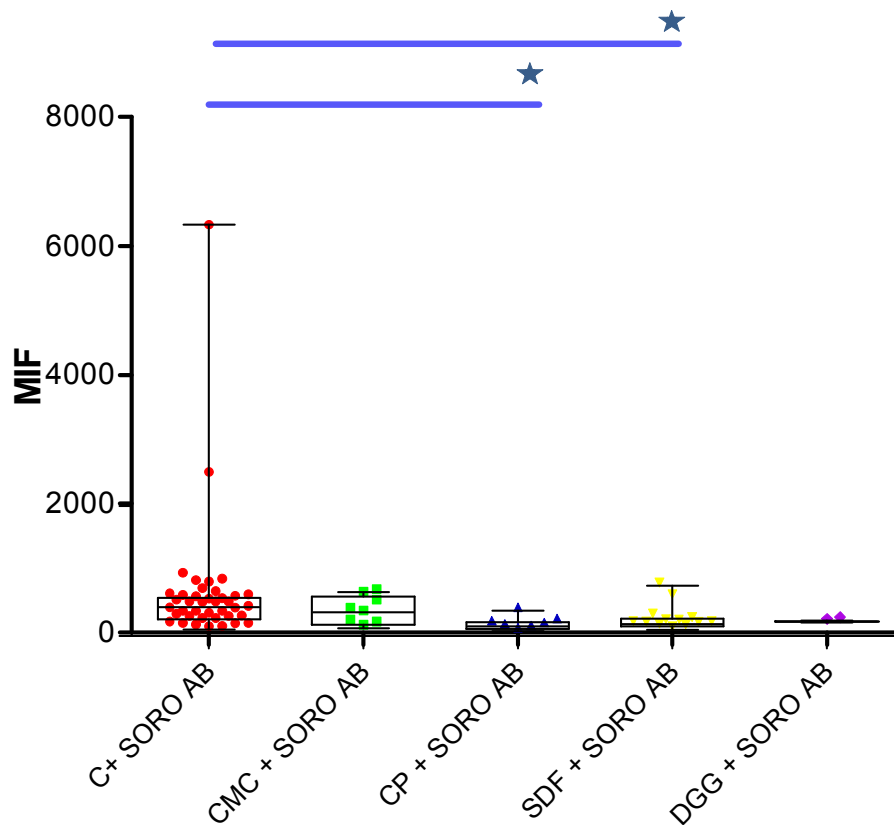
Na avaliação da média de intensidade de fluorescência da capacidade Fungicida sem opsonização houve diferença significativa entre os grupos controle e CP ($p=0,0024$) e no grupo controle X SDF ($p=0,0195$) (Figura 42).

Figura 42 - Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de *Candida albicans* sem opsonização. nos grupos controle, CMC, CP, SDF



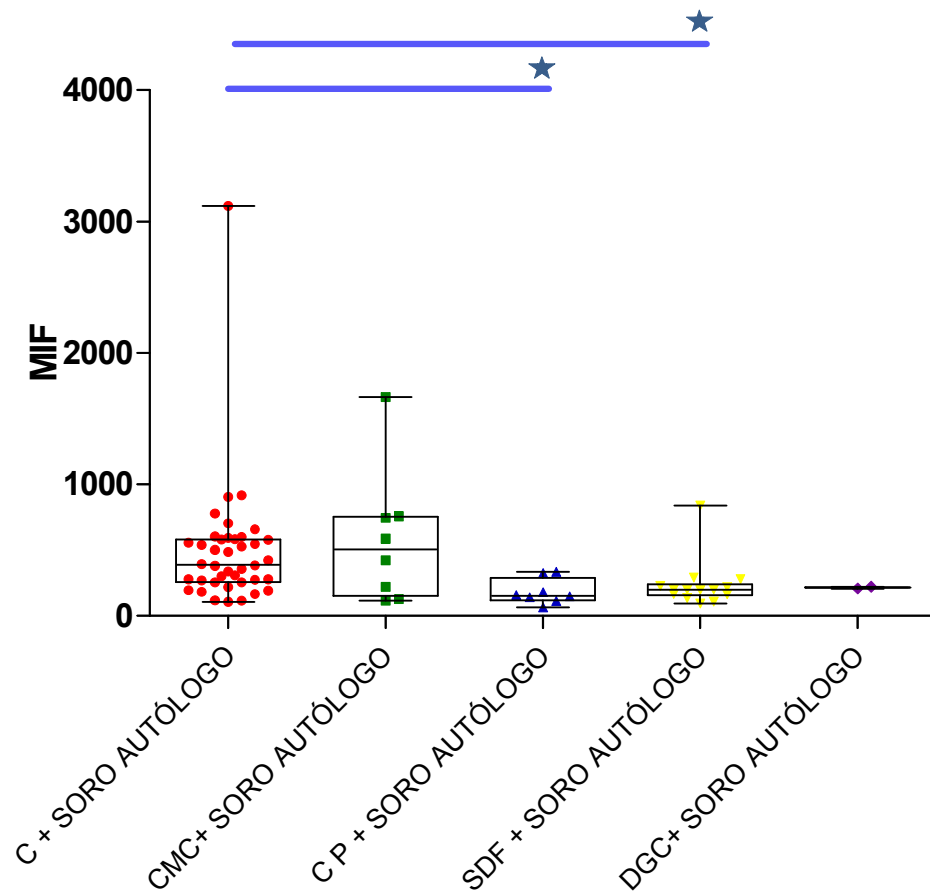
Na avaliação da média de intensidade de fluorescência da capacidade fungicida opsonizando-se com soro AB houve diferença significativa entre todos os grupos ($p= 0,0071$) e grupo controle com CP ($p= 0,0039$) e controle com SDF ($p=0,0087$) (Figura 43).

Figura 43 - Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de *Candida albicans* opsonizada com soro AB nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC.



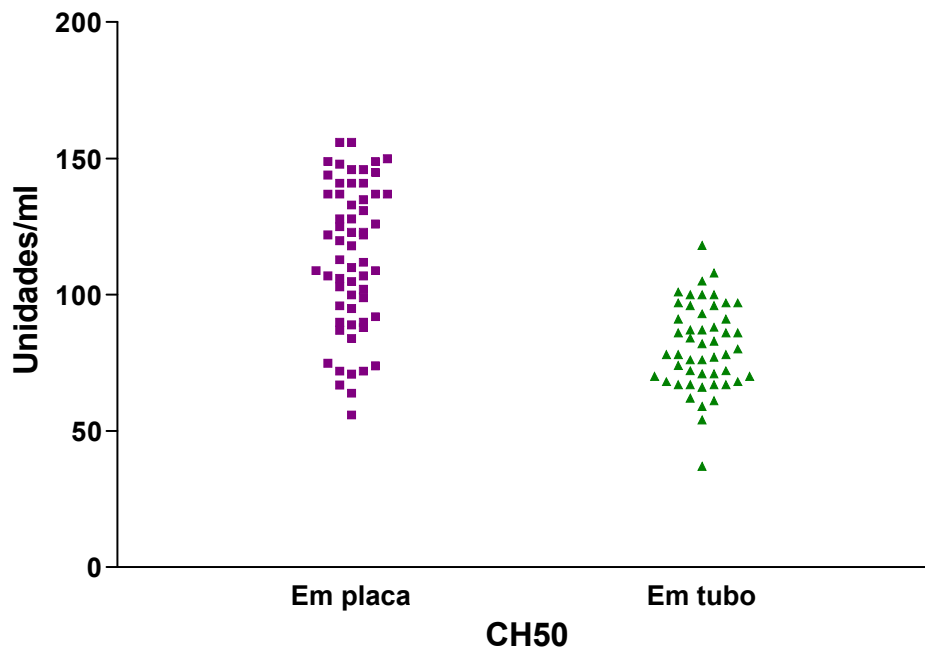
Na avaliação da média de intensidade de fluorescência da capacidade fungicida opsonizando-se com soro autólogo houve diferença significativa entre todos ($p= 0,0015$), nos grupos controle e CP ($p=0,0017$) grupo controle e SDF ($p=0,0016$), verificando-se redução nestes grupos (Figura 44).

Figura 44 - Média da intensidade de Fluorescência da Morte intracelular de *Candida albicans* opsonizados com soro autólogo nos grupos controle, CMC, CP, SDF e DGC..



4.G Ensaio hemolíticos para avaliação da integridade das via clássica (CH50)

Figura 45 - Valores de CH50 realizado em placa e em tubo em amostras de doadores de sangue

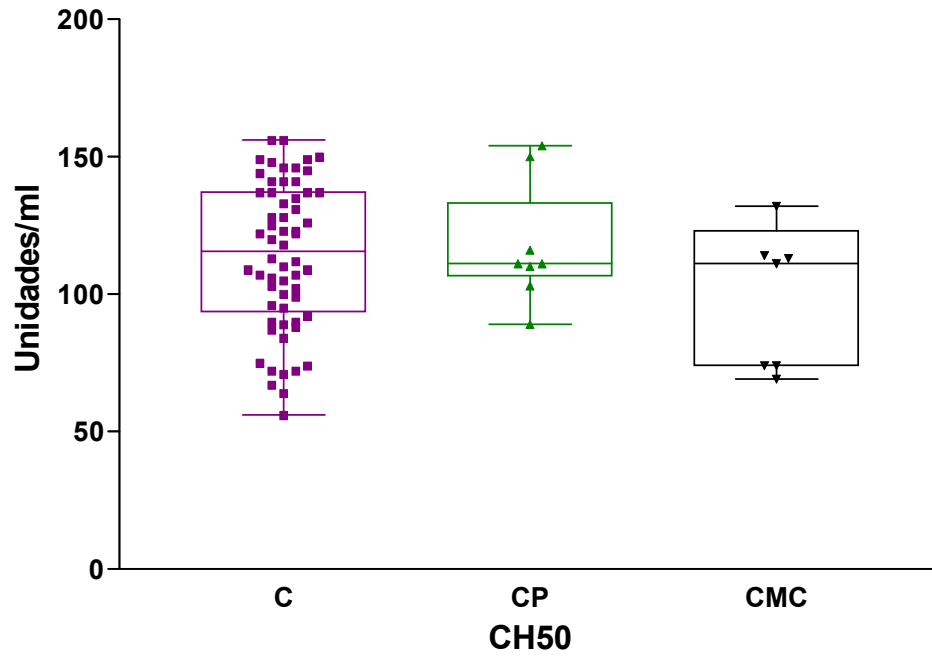


Legenda

Ensaio	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Em placa	56 U/ml	156U/ml	115 U/ml	114U/ml	27
Em tubo	37 U/ml	118U/ml	79 U/ml	81 U/ml	16

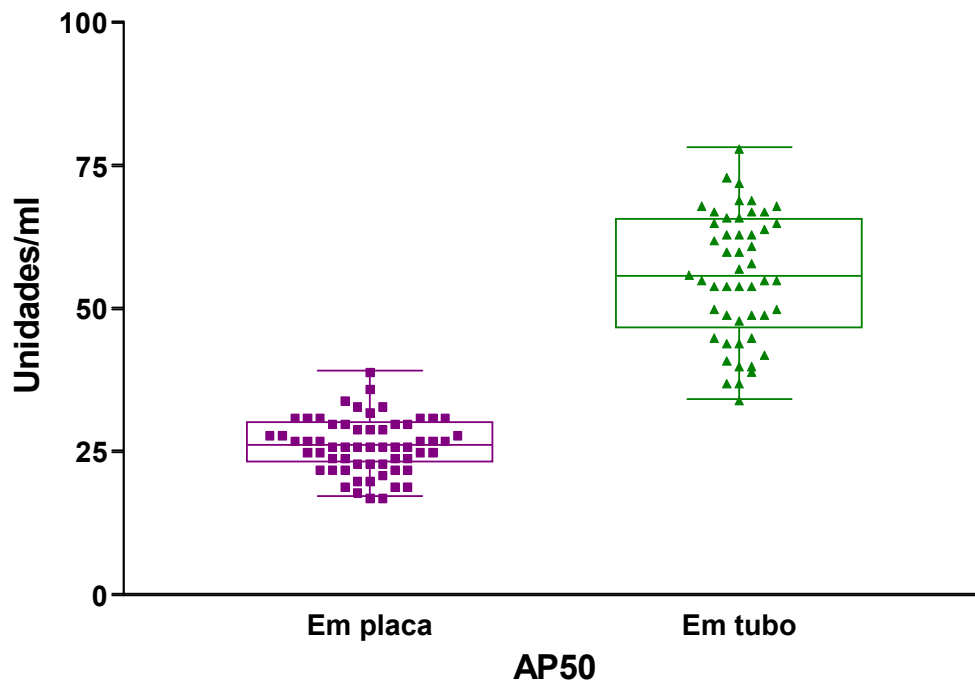
Para a integridade da via de AP 50 foram avaliados 70 indivíduos sadios, 7 indivíduos com CMC e 9 indivíduos com CP. Todos se encontraram dentro do padrão de normalidade do teste.

Figura 46 - Valores de CH50 realizado em placa nas amostras de um grupo controle (C), pacientes com Candidíase persistente (CP) e com Candidíase Mucocutânea crônica (CMC). Todos



4.G.a Ensaios hemolíticos para avaliação da integridade da via alternativa (AP50).

Figura 47 - Valores de AP50 realizado em placa e em tubo em amostras de doadores de sangue



5 DISCUSSÃO

Os fagócitos desempenham um papel relevante na defesa da pele e as manifestações cutâneas relacionadas com as imunodeficiências primárias são freqüentes, estimando-se que cerca de 80% dos defeitos imunitários acometem a pele (Moraes Vasconcelos et al, 2008). Nos últimos anos, a identificação de distúrbios da imunidade inata ampliou a necessidade de se estabelecer testes laboratoriais capazes de selecionar possíveis casos que deveriam ser avaliados com exames imunológicos mais específicos (Notarangelo & Fischer, 2009). A avaliação imunológica mais ampla de pacientes ainda é restrita a poucos centros de pesquisa em nosso país. Nestes últimos anos tem se verificado um interesse crescente na avaliação funcional de polimorfonucleares e sua interação com outros setores da resposta imune (Notarangelo & Fisher, 2009).

Os neutrófilos podem ser avaliados em cada etapa de sua atividade: adesão, quimiotaxia, fagocitose e morte intracelular, reconhecendo-se que em cada uma destas etapas pode haver comprometimento de outros fatores que interferem com a capacidade funcional destas células (Hei et al, 2002; Pober, 1995,). Por exemplo, uma deficiência do sistema complemento pode atrapalhar o processo de quimiotaxia. Grumach et al, 1988) descreveram um paciente com deficiência de C3 e verificaram defeito de quimiotaxia e fagocitose neste paciente resultando em infecções bacterianas de repetição. Para tanto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer a metodologia existente para a avaliação das funções fagocitárias, implantar novos testes

imunológicos que sejam mais acessíveis e testar estas técnicas em situações clínicas reconhecidas como decorrentes de distúrbios de fagócitos (Doença Granulomatosa Crônica) ou imunodeficiências cujo envolvimento dos fagócitos ainda é pouco conhecido. Sugerindo a possibilidade que ensaios específicos possam triar pacientes com situações clínicas muito semelhantes a distúrbios de fagócitos, incluiu-se um grupo denominado de “sugestivo de distúrbio de fagócito”. Considerando-se que o comprometimento do sistema complemento poderia prejudicar as funções fagocitárias, os pacientes foram avaliados também neste aspecto.

Antes do estabelecimento dos grupos de pacientes havia necessidade de se padronizar as diversas técnicas a serem implantadas. Para tanto, um grupo controle de voluntários sadios foi coletado e avaliado. Iniciou-se com a realização do teste de triagem de função fagocitária tradicional, o **NBT**, feito simultaneamente com a avaliação do “burst” oxidativo pelo **teste da dihidrorodamina (DHR)**, este já utilizando a citometria de fluxo. Uma das vantagens da citometria de fluxo é que a maioria das funções dos neutrófilos pode ser medida usando um volume muito pequeno de sangue total. A leitura do teste do NBT é feita pelos técnicos, portanto há a subjetividade e um número bem menor de células é contado em comparação com a citometria. Outro fator relevante é a necessidade de realização imediata do teste do NBT, enquanto que há a possibilidade de se aguardar até 24 horas para a realização do ensaio do DHR, como foi testado por nós.

Diferentes sondas fluorescentes podem ser usadas para detecção de fluorescência no citômetro de fluxo para o teste do burst oxidativo, três

destas sondas são as mais usadas: 2'7' - diacetato diclorofluoresceína (DCF) (Bass et al, 1983), diacetato de 5,6-carboxi-2'7'-diclorofluoresceína, bis (acetoximetil) ester (Hockenbery et al, 1993) e 123 dihidrorodamina (DHR) (Rothe et al, 1988; Kinsey et al, 1987). Neste estudo preferiu-se utilizar a sonda 123-dihidrorodamina (DHR) por ser considerada a mais específica para avaliar indivíduos com suspeita de DGC, como mostra o trabalho de Vowells et al, 1995.

O sangue total foi utilizado para os testes, pois, a coleta de volumes pequenos seria mais adequada para os pacientes pediátricos e, ainda, pelo fato que a separação de neutrófilos poderia resultar em mudança funcional ou fenotípica destas células, afetando o resultado do “burst” oxidativo, como mostram os trabalhos de Repo et al.(1993), Macey et al.(1992) e Küijpers et al.(1991).

Verificou-se que alguns pacientes com CMC já apresentavam valores de DHR mais elevados mesmo sem estimulação, sugerindo que a própria infecção fúngica persistente pudesse estimular as células do paciente. Entretanto, quando avaliado o metabolismo oxidativo com a ativação celular por formol miristato acetato (PMA) para a produção reativa do oxigênio (ROS), os pacientes com candidíase persistente (CP) e candidíase mucocutânea crônica (CMC) apresentavam função normal quando comparados aos controles.

Ao se realizar o DHR estimulado esperava-se que houvesse a identificação dos pacientes com DGC e valores intermediários para as portadoras de DGC, entretanto, pacientes com sintomas de defeitos de

fagócitos também apresentaram uma menor resposta ao DHR estimulado por PMA.

A **quimiotaxia tradicional** descrita na literatura é realizada com lipopolissacaríde de *E.Coli*, mas em decorrência do grupo de pacientes com CMC e CP, padronizou-se o mesmo experimento com a estimulação com fungos *Candida albicans* vivos para verificar se haveria alteração de resposta específica ao patógeno persistente nestes casos. Entretanto, a resposta quimiotática encontrava-se prejudicada nos pacientes com CMC tanto com o estímulo LPS como por *Candida* quando se acrescentou soro autólogo. Este ensaio não se mostrou significativo quando foi acrescentado soro AB ou não houve estímulo. Estes resultados sugerem a possibilidade de fatores séricos atuarem prejudicando a atividade quimiotática nos pacientes com CMC.

Van Scoy et al, (1975), encontraram em pacientes com CMC a associação de hipergamaglobulinemia E, redução de quimiotaxia de neutrófilos, além das alterações da imunidade mediada por linfócitos T. Van Der Meer et al, (1978), notaram uma redução da capacidade fungicida para cândida em monócitos, sem alteração na quimiotaxia ou funções de neutrófilos. Yamazaki et al, (1984), encontraram redução de atividade quimiotática, diminuição da atividade do fator de inibição da migração de monócitos e da fagocitose para *Candida*, com capacidade bactericida para *Staphylococcus aureus* normal, o que sugere uma alteração específica.

Outro fator muito importante a ser avaliado é a **aderência dos patógenos** às células, pois esta varia muito de um experimento a outro,

como de indivíduo para indivíduo, dificultando a padronização de um valor de referência. Assim, torna-se importante para se ter certeza se há ou não aderência de patógenos às células dos indivíduos. Não se verificou diferenças significativas nos grupos avaliados em relação aos controles.

Os ensaios de **fagocitose de microrganismos** fazem parte das metodologias mais completas para avaliação das funções dos fagócitos por permitirem observações diretas da capacidade das células de ingerir e destruir uma variedade de patógenos. Poucos são os laboratórios clínicos que executam os ensaios disponíveis para avaliação da função microbicida de fagócitos, sendo utilizados em pesquisa pelo fato das técnicas empregadas para esta avaliação serem trabalhosas, necessitando de um período longo para a sua realização. Outras metodologias que são menos trabalhosas necessitam de leitura imediata, por exemplo, em microscopia óptica (técnica com fluorocromo laranja de acridina) (Bellinati-Pires et al, 1995). Alguns laboratórios clínicos realizaram este ensaio aplicando um teste microbiológico de cultura quantitativa após um período de incubação das células fagocitárias com o microrganismo alvo, determinando-se a morte microbiana pelo decréscimo do número de unidades formadoras de colônia (“colony forming units” – cfu) (Malloe, 1946; Mackanes, 1960).

Vários outros métodos têm sido propostos para avaliação da fagocitose ou da opsonofagocitose de leveduras com uso de: partículas de látex, zimosan, eritrócitos, agregados de IgG, bactérias e leveduras (Leijh et al, 1986). O tempo de execução dos testes atuais, a necessidade de associação destes métodos com outros procedimentos tecnológicos para

avaliação da ingestão dos microrganismos aumenta o custo operacional, limitando sua utilização em laboratórios clínicos. Atualmente, em laboratórios de maior recurso, vem-se empregando a técnica para avaliação de fagócitos por citometria de fluxo. Este método pode resolver a heterogeneidade de uma população de células, facilitando a identificação e caracterização de subpopulações celulares e seus compartimentos (Conklyn et al, 1996). Outro dado importante do citômetro é a marcação de “*gatings*” que podem avaliar vários parâmetros de uma só vez para cada experimento. Estes dados também foram discutidos por Duque e Ward (1987), onde abordam que técnicas com “*gating*” permitem a análise dos parâmetros estruturais e funcionais em uma grande população de células intactas, excluindo aqueles que são agregadas ou lisadas.

A análise apurada de **fagocitose** requer muito conhecimento sobre o tipo de alvo e fluorocromo a serem usados, além do controle da proporção leucocitária (Lehman et al, 2000). Defeitos de fagócitos podem ser identificados em ensaios que utilizam microrganismos corados com substâncias fluorescentes (Wilson et al, 1985; Derer et al, 1983). Este ensaio, além de ser mais rápido, menos trabalhoso e mais sensível que os demais, permite que o volume de sangue coletado dos indivíduos (principalmente em crianças) seja o mínimo possível.

Pacientes com DGC foram adicionados nestes experimentos por serem indivíduos afetados por graves infecções bacterianas, principalmente por *S.aureus*, portanto, sendo um bom parâmetro para avaliação do experimento. Os pacientes com DGC apresentaram tanto a fagocitose para

S.aureus como para *Candida* semelhante aos indivíduos controles sadios, assim como verificado por Lehmann et al. (2000). Chama a atenção, o prejuízo da fagocitose observada no grupo de pacientes com SDF, sugerindo a pesquisa de outros defeitos imunológicos.

Foram realizados vários experimentos de fagocitose tanto para bactérias como para fungos inativados e alguns achados foram importantes para validação dos experimentos. Na fagocitose, o Brometo de Etídio (BE) foi utilizado para marcar os patógenos aderidos à superfície da célula. Este procedimento acontece através de transferência de energia onde patógenos marcados com a fluorescência verde (FITC) e aderidos à célula perdem sua fluorescência e adquirem fluorescência vermelha após a marcação com brometo de etídio (BE). Desta forma, fungos de *Candida* ou bactérias que estão internalizados nas células permanecem verdes e os patógenos que estão aderidos às células marcam-se de vermelho (Szollossi et al,1984). O resultado é avaliado através de um gráfico biparamétrico em FL3. Outros autores utilizam o azul de tripan que marcaria os patógenos aderidos às células, porém, a utilização destas cores poderia causar uma sobreposição na identificação do canal do citômetro (Bjerknes and Bass; Hed, 1986).

A **morte intracelular de bactérias** mostrou-se reduzida em relação aos controles em pacientes com SDF, isto é, sintomas de deficiências de fagócitos. Deve-se ressaltar que embora seja um grupo que reúne situações clínicas diferentes como Síndromes de Hiper IgE, Chediak-Higashi e Netherton, a maioria dos pacientes apresentou processos infecciosos por

microrganismos intracelulares, em especial, relacionados com *S. aureus*. Neste grupo na houve diferença na incubação com soro AB ou autólogo.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e com CMC na morte intracelular de bactérias sem opsonização Este aspecto pode ser interpretado da mesma forma que o DHR sem estímulo mostrou-se “ativado” em pacientes com CMC.

A avaliação individual em relação ao controle do dia também pode trazer dados de interesse para o diagnóstico. Pacientes com CMC e CP mostraram capacidade bactericida para *S. aureus* prejudicada em relação ao controle realizado simultaneamente. Entretanto, nos grupos de CP e CMC, a aderência encontrava-se dentro do padrão, mostrando que mesmo na fagocitose com patógenos inativados pacientes com candidíase persistente e com candidíase mucocutânea crônica podem ter seus valores abaixo da normalidade, mas sua capacidade de aderir os patógenos as células são normais. Yamazaki et al, (1984), encontraram fagocitose para *Candida* alterada, com capacidade bactericida para *S aureus* normal, diferente dos nossos resultados.

A **fagocitose e morte intracelular de bactérias** é um ensaio muito mais fácil de ser realizado do que a **fagocitose e morte intracelular de fungos** *Cândida albicans*, pois os fungos podem formar hifas dificultando a fagocitose dos mesmos. Ocorre, muitas vezes, agregação de fungos nos experimentos formando pequenos coágulos e assim, dificultando o andamento do ensaio, pois, a agulha de aspiração do citômetro de fluxo é

muito fina, impedindo a leitura do ensaio. Esta dificuldade teve que ser superada no início do estudo.

Vários aspectos precisaram ser acertados para a padronização da capacidade fungicida por citometria de fluxo, ensaio não estabelecido anteriormente e aplicada em grupos incluídos no presente estudo.

De início, a utilização de fungos *Candida albicans* nos experimentos resultou em menor fagocitose e aderência tanto nos pacientes como nos indivíduos sadios, concluindo-se que o mesmo procedimento não seria satisfatório quando comparado aos resultados obtidos com os experimentos com bactérias. O ensaio foi padronizado com outros tempos de incubação (de 1 hora, 1:15h, 1:30h, 1:45h e 2:00h, 2:15h, 2:30h), alcançando-se um tempo ótimo de 2 horas e 30 minutos de incubação para fungos para avaliar fagocitose e morte de *Cândida albicans*, como foi observado por Saresella & Koda, (1997).

Os cuidados com variações de pH precisaram ser redobrados para que não houvesse uma interferência muito grande nas fluorescências, pois estas precisam de um pH normal variando de 7,0 a 7,4. O aumento do pH faz com que ocorra uma grande variedade nos valores de índice de fluorescência e também na porcentagem das células marcadas com o anticorpo específico. Pode ocorrer um “overlap” de fluorescências entre FL3 e FL2. Estes experimentos foram realizados tanto com e sem o anticorpo específico para ser avaliado se ocorriam falsos resultados na fagocitose e morte intracelular.

Outro fato que foi de muita importância para a padronização foi a relação de quantidade de patógeno para cada célula, utilizamos a proporção de 5 patógenos para cada célula.

A capacidade fungicida do grupo de pacientes com CMC mostrou-se prejudicada sem opsonização e mesmo opsonizando com soro autólogo. Comparando-se esta resposta, observa-se que a opsonização não alterou a morte intracelular dos fungos em pacientes com CMC. Este fato pode sugerir que um fator sérico pode interferir na resposta destes indivíduos à *Candida*. No contexto avaliado, o complemento encontrava-se normal, sugerindo não ser este o fator responsável pela função prejudicada. Estes resultados foram encontrados por Lehmann et al. (2000) usando outras metodologias.

Um fator que foi avaliado e que não foi relatado anteriormente na literatura é a quantidade de células de cada indivíduo que ficaram integras pós estímulo com patógenos específicos. Observou-se que após a ativação das células pelos patógenos, ocorre uma diminuição significativa na quantidade destas células nos indivíduos com CP e com CMC quando comparados com as células do grupo controle. Seria este fator muito importante para fagocitose ou morte intracelular *in vivo*? Pela quantidade de células que ficam reduzidas, seria esta em pequenas quantidades para poder eliminar os patógenos do organismo? Já nos pacientes com suspeita de imunodeficiências, as células continuam com a mesma quantidade, mas não fagocitam e não matam satisfatoriamente.

Diante do que foi apresentado, o ensaio de morte intracelular foi o teste que mais forneceu subsídios para detecção de defeitos funcionais de

fagócitos. A sua padronização com bactérias e fungos ampliou as possibilidades de mecanismos envolvidos em doenças até o momento não identificadas. Este aspecto é um fator de ansiedade no sentido de determinar qual o defeito imunológico que determina o quadro clínico do paciente. O estabelecimento de ensaios mais fáceis estabelecimento, utilizando métodos mais rápidos e reprodutíveis poderá detectar situações clínicas até o momento encaradas como inexplicáveis. A recente publicação de Singh et al. (2009) demonstrando o prejuízo do sistema NADPH em doenças como IRAK4 e NEMO pode corroborar a necessidade de um teste de triagem que não seja limitado ao diagnóstico de Doença Granulomatosa Crônica.

6 CONCLUSÃO

O ensaio do DHR é sensível e preciso para o diagnóstico de DGC e pode detectar outros defeitos acometendo as espécies reativas do oxigênio. Ainda, pode ser realizado após 24 horas da coleta de sangue do paciente.

A atividade quimiotática dos pacientes com CMC mostrou-se alterada após estímulo específico com *Candida* com soro autólogo não se observando o mesmo com o soro AB. Este dado sugere que um fator sérico possa interferir na capacidade quimiotática destes pacientes.

A realização do ensaio de quimiotaxia com vários estímulos como *Candida albicans* e não somente com LPS permite o reconhecimento de outros déficits funcionais.

A fagocitose e aderência de bactérias e fungos não se mostraram totalmente eficazes para um diagnóstico satisfatório de distúrbios de fagócitos.

Não houve comprometimento do sistema complemento nos grupos de pacientes avaliados: DGC, portadores de DGC, CMC, CP e SDF.

Os ensaios de capacidade bactericida e fungicida (morte) mostraram-se relevantes para detecção de defeitos de opsonofagocitose. Pacientes com Candidíase persistente e Candidíase Mucocutânea Crônica apresentam um defeito específico da morte intracelular de Cândida.

A avaliação de um grupo com sintomas de deficiências de fagócitos permitiu detectar situações clínicas cujos ensaios de fagocitose com morte intracelular poderia ser utilizado para a triagem da função fagocitária.

O ensaio de **fagocitose e morte intra celular por citometria de fluxo** pode ser usado como triagem de suspeita de distúrbios de fagócitos e é um ensaio que reflete com muito mais precisão o comportamento *in vivo* da função de neutrófilos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed, Saunders; 2010, pp. 270-90.
- Arbiser JL. (1995). "Genetic immunodeficiencies: cutaneous manifestations and recent progress." *J Am Acad Dermatol*. 1995;33(1):82-89.
- Beilin B, Grinevich G, Yardeni IZ, Bessler H. "Tramadol does not impair the phagocytic capacity of human peripheral blood cells". *Can J Anaesth*. 2005; 52(10):1035-9.
- Baehner R L; Nathan DG. "Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease." *N Engl J Med*. 1968;278(18):971-6.
- Bellinati-Pires R, Melki SE, Colletto GM, Carneiro-Sampaio MM. "Evaluation of a fluorochrome assay for assessing the bactericidal activity of neutrophils in human phagocyte dysfunctions." *J Immunol Methods*. 1989;119(2):189-96.
- Bellinati-Pires R, Salgado MM, Ypolito IP, Grumach AS, Carneiro-Sampaio MMS. "Application of a fluorochrome-lysostaphin assay to the detection of phagocytic and bactericidal disturbances in human neutrophils and monocytes." *J Investig Allergol Clin Immunol* 1995;5(6):337-42.
- Bellinati-Pires R; Constantino-Silva RN. In: Grumach AS. *Alergia e Imunologia na Infância e Adolescência*, Atheneu, São Paulo, 2009, pp 475-85.
- Berron-Ruiz AR, Berron-Perez R, Ruiz-Maldonado R. "Cutaneous markers of primary immunodeficiency diseases in children." *Pediatr Dermatol*;2000; 17(2):91-6.

- Beutler B; Casanova JL. "New frontiers in immunology. Workshop on the road ahead: future directions in fundamental and clinical immunology." *EMBO Rep* 2005;6(7):620-3.
- Bortolussi R, Faulkner G, Lee SH, Ozere R. "Phagocytosis of *Candida albicans* in chronic mucocutaneous candidiasis." *Pediatr Res*; 1981;15(9):1287-92.
- Boxer LA; Smolen JE. "Neutrophil granule constituents and their release in health and disease." *Hematol Oncol Clin North Am*; 1988;2(1):101-34.
- Boyden S. "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." *J Exp Med*. 1962; 115:453-66.
- Buchwald UK, Geerdes-Fenge HF, Vöckler J, Ziege S, Lode H. "Interleukin-10: effects on phagocytosis and adhesion molecule expression of granulocytes and monocytes in a comparison with prednisolone." *Eur J Med Res*. 1966; 4(3): 85-94.
- Cantürk NZ, Vural B, Esen N, Cantürk Z, Oktay G, Kirkali G, Solakoglu S. "Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on incisional wound healing in an experimental diabetic rat model." *Endocr Res*. 1999; 25(1):105-16.
- Christensson B, Hedstrom SA, Kronvall G. "Detection of *Staphylococcus aureus* antibodies in patients with *S. aureus* infections and in normal persons, using solid phase radioimmunoassay." *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 1982;90(3): 251-5.
- Condino Neto A, Grumach AS. Defeitos Funcionais de Fagócitos. In: Grumach, AS. *Alergia e Imunologia na Infância e Adolescência*. Atheneu, São Paulo, 2009, pp 629-43.
- Cross AR, Erickson RW, Curnutte JT. "Simultaneous presence of p47(phox) and flavocytochrome b-245 are required for the activation of NADPH

- oxidase by anionic amphiphiles. Evidence for an intermediate state of oxidase activation." *J Biol Chem*. 1999;274(22):15519-25.
- Curnutte, J. T. "Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level." *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;67(3 Pt 2): S2-15.
- DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. "Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly." *J Clin Invest*. 1998;101(2):455-63.
- Dérer M, Walker C, Kristensen F, Reinhardt MC. "A simple and rapid flow cytometric method for routine assessment of baker's yeast uptake by human polymorphonuclear leukocytes." *J Immunol Methods*. 1983; 61(3):359-65.
- Dias da Silva W, Kipnis TL. Complement system: an ingenious biochemical mechanism, a co-participant in the natural defense and a mediator of cell interaction *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1984;30(3-4):67-72.
- Djawari D. "Deficient phagocytic function in Papillon-Lefevre syndrome." *Dermatologica*. 1978;156(3):189-92.
- Djeu JY, Blanchard DK. "Regulation of human polymorphonuclear neutrophil (PMN) activity against *Candida albicans* by large granular lymphocytes via release of a PMN-activating factor." *J Immunol*. 1987; 139(8): 2761-7.
- Douglas SD, Yoder MC. "The mononuclear phagocyte and dendritic cell systems. In: Stiehm, E.R. ed. Immunological disorders in infants and children. Philadelphia, 1996. Saunders .p.113-32.
- Duque RE, Ward PA. "Quantitative assessment of neutrophil function by flow cytometry." *Anal Quant Cytol Histol*. 1987; 9(1):42-8.
- Erdei A, Fust G, Gergely J. "The role of C3 in the immune response." *Immunol Today*. 1991;12(9):332-7.

- Fattom AI, Sarwar J, Basham L, Ennifar S, Naso R. "Antigenic determinants of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharide vaccines." *Infect Immun*. 1998;66(10): 4588-92.
- Fournier JM, Vann WF, Karakawa WW. "Purification and characterization of Staphylococcus aureus type 8 capsular polysaccharide." *Infect Immun*. 1984; **45**(1): 87-93.
- Frank MM. "Detection of complement in relation to disease." *J Allergy Clin Immunol*. 1991;89(3):641-8.
- Franzke S, Calderone RA, Schaller K. "Isolation of avirulent clones of Candida albicans with reduced ability to recognize the CR2 ligand C3d." *Infect Immun*, 1993;61(6): 2662-9.
- Goldberg LS, Bluestone R, Barnett EV, Landau JW. "Studies on lymphocyte and monocyte function in chronic mucocutaneous candidiasis." *Clin Exp Immunol*. 1971; 8(1): 37-43.
- Groemping Y, Rittinger K. "Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective." *Biochem J*. 2005;386(Pt 3):401-16.
- Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P. "An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients." *J Cell Biol*. 2002; 159(1): 91-102.
- Höglund M, Håkansson L, Venge P. "Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers." *Eur J Haematol*. 1997; 58(3): 195-202.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença.*, Artmed 2007, pp.405-15.
- Johnston JR, RB. "Clinical aspects of chronic granulomatous disease." *Curr Opin Hematol*. 2001; 8(1): 17-22.

- Johnstone CC, Farley A. "The physiological basics of wound healing." *Nurs Stand*. 2005; 19(43): 59-65.
- Joiner KA, Hawiger A, Gelfand JA. "A study of optimal reaction conditions for an assay of the human alternative complement pathway." *Am J Clin Pathol*. 1983; 79(1): 65-72.
- Kindt S, Van Oudenhove L, Broekaert D, Kasran A, Ceuppens JL, Bossuyt X et al. "Immune dysfunction in patients with functional gastrointestinal disorders." *Neurogastroenterol Motil*. 2009; 21(4): 389-98.
- Kirk SM, Callister SM, Lim LC, Schell RF. "Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry." *J Clin Microbiol*. 1997; **35**(2): 358-63.
- Kirkpatrick CH, Smith TK. "Chronic mucocutaneous candidiasis: immunologic and antibiotic therapy." *Ann Intern Med* 1974;80(3):310-20.
- Klebanoff SJ, Clark RA. "The neutrophil: function and clinical disorders. In: Klebanoff SJ, Clark RA, eds. Amsterdam: North Holland Publishing, 1993.pp.641-80.
- Krumholz W, Endrass, J.Hempelmann, G. "Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents in vitro" *British J Anaesthesia*, 1995; (75): 66-7
- Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K. "Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox." *J Biol Chem*. 2002;277(12):10121-8.
- Lehrer RI. "The fungicidal mechanisms of human monocytes. I. Evidence for myeloperoxidase-linked and myeloperoxidase-independent candidacidal mechanisms." *J Clin Invest*. 1975;55(2):338-46.
- Leijh PC, Breedveld FC, Lafeber GJ, Van den Barselaar MT. " Phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear

- cells from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis". *J. Arthritis Rheum.* 1986;29(2):166-73.
- Lehmann AK, Sørnes S, Halstensen A. "Phagocytosis: measurement by flow cytometry" *J Immunol Methods.* 2000;243(21): 229-42
- Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. "New insights into atopic dermatitis." *J Clin Invest.* 2004;113(5): 651-7.
- Lun A, Schmitt M, Renz H. "Phagocytosis and Oxidative Burst: Reference Values for Flow Cytometric Assays Independent of Age" *Clinical Chemistry* 2000;46:1836-9.
- Mackaness GB. "The phagocytosis and inactivation of staphylococci by macrophages of normal rabbits." *J Exp Med.* 1960;112:35-53.
- Marks DJ, Rahman FZ, Sewell GW, Segal AW. Crohn's disease: an immune deficiency state. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010; 38(1):20-31.
- Marodi L, Forehand JR, Johnston RP. "Mechanisms of host defense against Candida species. II. Biochemical basis for the killing of Candida by mononuclear phagocytes." *J Immunol.* 1991;146(8):2790-4.
- Marodi L, Schreiber S, et al. "Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors." *J Clin Invest.* 1993;91(6): 2596-2601.
- McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Doring G, Lee JC et al. "Broadly protective vaccine for Staphylococcus aureus based on an in vivo-expressed antigen." *Science,* 1999; 284(5419):1523-7.
- Metchikoff E. "Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes." *Ann Inst Pasteur, Paris,* 1987;1:321.

- Minucci A, Delibato E, Castagnola M, Concolino P, Ameglio F et al. "Identification of RFLP G6PD mutations by using microcapillary electrophoretic chips (Experion)." *J Sep Sci*. 2008;31(14): 2694-700.
- Moraes-Vasconcelos D, Grumach AS, Cordeiro E, Barros NC, Ferreira MD, Oliveira JB, Duarte AJS. The relevance of dermatological findings to the diagnosis of primary immunodeficiencies: Report of a specialized outpatient group: ESID 2008, 2008, s-Hertogenbosch. *Annals of ESID*, 2008.
- Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammartröm L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. "Primary immunodeficiencies: 2009 update." *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1161-78.
- Ochs HD, Wedgwood RJ, Frank MM, Heller SR. "The role of complement in the induction of antibody responses." *Clin Exp Immunol*. 1983;53(1):208-16.
- Ohno Y, Seligmann BE, et al. "Cytochrome b translocation to human neutrophil plasma membranes and superoxide release. Differential effects of N-formylmethionylleucylphenylalanine, phorbol myristate acetate, and A23187." *J Biol Chem*. 1985; 260(4): 2409-2414.
- Orrego JC, Montoya CJ, Gómez RD, Franco JL, Aquino PJ, Vargas ME et al. "Epidemiological assessment of mucocutaneous infections in patients with recurrent infection syndrome." *Int J Dermatol*. 2005; 44(9):724-30.
- Pattanapanyasat K., Sukapirom K, et al. "Flow cytometric quantitation of opsonophagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* using a whole blood microassay." *Cytometry A*. 2007; 71(12): 1027-33.

- Perticarari S, Presani G, Banfi E. "A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood." *J Immunol Methods* 1994;170(1):117-24.
- Peterson PK, Verhoef J, Schmeling D, Quie PG. "Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes." *J Infect Dis.* 1977;136(4):502-9.
- Petty HR, Todd RF. "Integrins as promiscuous signal transduction devices." *Immunol Today* 1996;17(5):209-12.
- Plested JS, Ferry BL, Coull PA, Makepeace K, Lehmann AK, et al. "Functional opsonic activity of human serum antibodies to inner core lipopolysaccharide (galE) of serogroup B meningococci measured by flow cytometry." *Infect Immun.* 2001;69(5): 3203-13.
- Quie PG, Mills EL, Roberts RL, Noya FJD. Disorders of the polymorphonuclear phagocytic system. In: Stiehm ER, ed. Immunological disorders in infant and children. Philadelphia: Saunders, 1996. pp 443-68.
- Richardson MD, Kokki MH "Diagnosis and prevention of fungal infection in the immunocompromized patient." *Blood Rev* 1998;12(4): 241-54.
- Rosenblatt HM, Stiehm ER. "Therapy of chronic mucocutaneous candidiasis." *Am J Med* 1983;74(1B): 20-2.
- Rosenzweig SD, Holland SM. "Phagocyte immunodeficiencies and their infections." *J Allergy Clin Immunol* 2004,113(4): 620-6.
- Ross GD. "Membrane complement receptors". In: Lachmann PJ, Peters DK, Rosen FS, Walport MJ. Clinical aspects of immunology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1993. p.241-64.
- Sasada M, Johnston Jr, RB. "Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages." *J Exp Med* 1980;152(1):85-98.

- Saresella SMKR, Speciale L, Taramelli D, Mendozzi E, Guerini F. "A rapid evaluation of phagocytosis and killing of *Candida albicans* by CD13q leukocytes" *J Immunol Methods* 1997;210:227–34
- Scholnicoff ET, MacGinnitie AJ, Lin PL, Darville T. "Chronic granulomatous disease in an adolescent with recurrent impetigo and cholecystectomy". *JPediatr Infect Dis* ;2009;28(3):255-7
- Scriver CR. ("Disease, war, and biology: languages for medicine--and pediatrics." *Pediatr Res* 1995;38(6): 819-29.
- Segal AW. "The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease." *Mol Med Today*. 1996;2(3):129-35.
- Shiloh MU, Ruan J, Nathan C, Evaluation of Bacterial Survival and Phagocyte Function with a Fluorescence-Based Microplate Assay" *J.Infection and Immunity*. 1997;65(8):3193–8.
- Singh A, Zarembler KA, Kuhns DB, Gallin JI. "Impaired priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase in patients with IRAK4 or NEMO deficiency." *J Immunol* 2009;182(10): 6410-7.
- Smith DL, Rommel F. "A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbiocidal activity of human peripheral blood leukocytes in vitro." *J Immunol Methods*. 1977;17(3-4):241-7.
- Snyderman R, Altman LC, Frankel A, Blaese RM. "Defective mononuclear leukocyte chemotaxis: a previously unrecognized immune dysfunction. Studies in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis." *Ann Intern Med* 1973; 78(4): 509-13.
- Sohnle PG, Frank MM, Kirkpatrick CH. "Mechanisms involved in elimination of organisms from experimental cutaneous *Candida albicans* infections in guinea pigs." *J Immunol* 1976;117(2):523-30.

- Soler-Palacín P, Margareto C, Llobet P, Asensio O, Hernández, M., Caragol, I.,Español, T. "Chronic granulomatous disease in pediatric patients: 25 years of experience". *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007;35(3):83-9.
- Stossel TP. "From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly." *J Biol Chem* 1989;264(31):18261-4.
- Szöllösi J, Trón L, Damjanovich S, Helliwell SH, Arndt-Jovin D, Jovin TM. "Fluorescence energy transfer measurements on cell surfaces: a critical comparison of steady-state fluorimetric and flow cytometric methods." *Cytometry* 1984;5(2): 210-6.
- Talbott MC, Miller LT, Kerkvliet NI "Pyridoxine supplementation: effect on lymphocyte responses in elderly persons." *Am J Clin Nutr* 1987;46(4): 659-64.
- Thornton BP, V. Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. "Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18)." *J Immunol* 1996; 156(3): 1235-46.
- Todd, R. F. "The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3)." *J Clin Invest* 1996;98(1): 1-2.
- Unkeless, J. C. "Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G." *J Clin Invest* 1989;83(2):355-61.
- Van Der Meer JW, Leijh PC, Van Den Barselaar, Van Furth R. "Functions of phagocytic cells in chronic mucocutaneous candidiasis." *Br Med J* .1978;1(6106):147-8.
- Van Scoy RE, Hill HR, Quie PG. "Familial neutrophil chemotaxis defect, recurrent bacterial infections, mucocutaneous candidiasis, and hyperimmunoglobulinemia E." *Ann Intern Med* 1975;82(6) 766-71.

- Verhoef J, Peterson PK, et al. "Kinetics of staphylococcal opsonization, attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leukocytes: a quantitative assay using [3H]thymidine labeled bacteria." *J Immunol Methods* 1977; 14(3-4):303-11.
- Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit N, Fleisher TA. "Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes." *J Immunol Methods* 1995;178(1):89-97.
- Walker SM, Urbaniak SJ. "A serum-dependent defect of neutrophil function in chronic mucocutaneous candidiasis." *J Clin Pathol* 1995;33(4): 370-2.
- Wilkinson PC. Locomotion and chemotaxis of leukocytes. In: Wier DM. ed. *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1986, pp. 51.1-16.
- Wilson RM, Galvin AM, Robins RA, Reeves WG. "A flow cytometric method for the measurement of phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes." *J Immunol Methods* 1985;76(2):247-53.
- Yamazaki M, Yasui K, Kawai H, Miyagawa Y, Komiyama AA, et al. "A monocyte disorder in siblings with chronic candidiasis. A combined abnormality of monocyte mobility and phagocytosis-killing ability." *Am J Dis Child* 1984; 138(2):192-6.
- Yang KD, Hill HR. "Neutrophil function disorders: pathophysiology, prevention, and therapy." *J Pediatr* . 1991;119(3):343-54.
- Yoshida A, Lebo RV "Existence of glucose-6-phosphate dehydrogenase-like locus on chromosome 17." *Am J Hum Genet* 1986;39(2): 203-6.
- Zhao T, Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. "The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils." *J Clin Invest*. 2003;112(11):1732-40.

ANEXOS

Anexo I

CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA 1



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/06/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0305/10**, intitulado: **"TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCITÁRIA EM IMUNODEFICIÊNCIAS E INFECÇÕES COM MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS"** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Anete Sevciovic Grumach**

Pesquisador (a) Executante: **Rosemeire Navickas Constantino Silva**

CAPPesq, 10 de Junho de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

Anexo II**CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA 2**

Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina do ABC
Mantida pela Fundação do ABC

Santo André, 16 de Dezembro de 2009.

PROTOCOLO CEP/FMABC, REGISTRADO SOB O Nº. 367/2009

Ilmo(a). Sr(a).

ANETE SEVCIOVIC GRUMACH

Prezado (a) Senhor (a):

Projeto de Pesquisa Intitulado: **TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCITÁRIA EM IMUNODEFICIÊNCIAS E INFECÇÕES COM MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS.**

Vimos por meio desta, informar que em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC, realizada em **16/12/2009**, foi **aprovado** o protocolo de pesquisa acima mencionado.

O Comitê de Ética em Pesquisa da FMABC, em obediência à Resolução 196/96, deverá encaminhar a CONEP/MS, relatórios anuais dos projetos de pesquisa que encontram-se em andamento. Solicitamos informar sobre o andamento do seu projeto anualmente isto é, se já foi concluído, suspenso ou se ainda está em andamento: neste último caso comunicar qual o tempo previsto para a conclusão do mesmo, e encaminhar breve resumo dos resultados obtidos no estudo.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos com os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Elie Fiss
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa da FMABC

Anexo III

Reagentes

- Anticorpo primário CD15 Invitrogen
- Anticorpo primário CD14;Invitrogen
- Anticorpo primário MY-7; Invitrogen
- Ágar sangue – Meio de cultura enriquecido utilizado para cultivo de fungos e bactérias Código A 6686 Sigma St.Louis MO EUA
- Bicarbonato de Sódio Código 55761 Sigma St.Louis MO EUA
Reagente utilizado no lise das hemácias das amostras;
- Brometo de Etídio código BRL-15585-011 Gibco– Reagente utilizado para marcar bactérias e fungos aderidos a superfície celular após ativação da função fagocítica;
- Butanol (Synth) – Reagente utilizado na coloração das membranas de quimiotaxia;
- Caldo Infusão de cérebro e coração (BHI) – Caldo utilizado para cultivar bactérias em meio líquido; BD
- Caldo Sabouraud – Dextrose 2% - Caldo utilizado para cultivar leveduras de fungos em meio líquido;MERCK
- Carbonato de Lítio – Reagente utilizado na coloração de membranas de quimiotaxia; MERCK
- Catalase código C-40(Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado na técnica de burst oxidativo

- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 (Instituto Adolfo Lutz) Bactéria marcada com Fitc (Fluoresceína)utilizada para avaliar a atividade fagocítica e morte intracelular realizada pelos neutrófilos;
- Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 (Instituto Adolfo Lutz) – Fungo marcado com Fitc (Fluoresceína)utilizada para avaliar a atividade fagocítica e morte intracelular realizada pelos neutrófilos;
- Cloreto de Amônia código A9434(Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado no lise das hemácias das amostras;
- Dihidrorodamina 123 (DHR 123) código D1054(Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado na técnica de citometria de fluxo no burst oxidativo , responsável pela fluorescência verde captada pelo citômetro quando estimulado com forbol miristato acetato;
- Deoxiribonuclease D-1052(Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado nas técnicas de avaliação de morte intracelular de fungos e bactérias;
- Dmso (Dimethyl Sulfoxide) código D-2650(Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado para diluição do Dhr e Pma;
- Dextran código D-5251 (Sigma St.Louis MO EUA) Reagente utilizado para separação de células mononucleares técnica de quimiotaxia;
- Edta código E-8186(Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado no lise das hemácias das amostras (concentração 0,5M);

-
- Etanol (Synth)– Reagente utilizado na coloração das membranas de quimiotaxia;
 - Extran (Merck) Detergente enzimático utilizado para remoção de gordura das lâminas de microscopia e vidrarias;
 - Hematoxilina (Merck)– Corante utilizada para coloração das membranas de quimiotaxia ;
 - Heparina (Liquemine – Roche) anticoagulante utilizado para evitar a coagulação das amostras de sangue logo após a coleta;
 - Iodeto de Propídeo (PI) código P4170(Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela fluorescência vermelha captada pelo laser do citômetro na capacidade de morte intracelular de fungos e bactérias;
 - Lâminas para Microscopia (Corning) – Utilizadas nas técnicas de quimiotaxia e NBT
 - Lipopolisacarídeo (LPS) código L4130– (Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado como estímulo para ativar o fator quimiotático das células na técnica de quimiotaxia;
 - Membranas de éster celulose 3 µm(Millipore) – Utilizadas na técnica de quimiotaxia;
 - Miristato acetato de forbol (PMA) P-8139 (Sigma St.Louis MO EUA) – Reagente utilizado como estímulo para ativação do burst oxidativo das células;
 - PBS (Phosphate-buffered saline, pH= 7,2 – 7,4) – Solução utilizada para diluição de reagentes e nas técnicas;

- RPMI – (Cultilab) – Reagente utilizado para lavagens de células na técnica de quimiotaxia;
- Soro Humano AB código H1388(Sigma St.Louis MO EUA) – Soro utilizado para opsonização de fungos e bactérias como controle positivo;
- Safranina – corante utilizado para corar neutrófilos na técnica do NBT
- Solução de Hanks (Cultilab) – Solução utilizada para lavagens das células nas técnicas;
- Xilol (Merck) Reagente utilizado para diafanização das membranas de quimiotaxia

Anexo IV

Preparo dos reagentes utilizados nas técnicas:

- **Solução de Hanks 1X**

No momento do uso diluiu-se a solução estoque concentrada 10X para 1X

100ml da solução concentrada 10X

900ml de H₂O destilada ultra pura

- **Solução RPMI 1X**

No momento do uso diluiu-se a solução estoque concentrada 10X para 1X

100mL da solução concetrada 10X

900ML de H₂O destildada ultra pura

- **DHR-123 (29mM) (Dihidrorodamina)– Solução Estoque**

Diluiu-se 10mg de dihidrorodamina em 1ml de DMSO (Dimethyl Sulfoxide), esta solução estoque foi acondicionada em ependorfs e mantidas em freezer -20⁰C antes do uso.

- **DHR-123 (29mM) (Dihidrorodamina)– Solução de uso**

Na hora do uso diluiu-se a solução estoque para 1 mM em solução de Hanks 1x

- **DEOXIRIBONUCLEASE**

Foi utilizada na concentração de 4000Kunitz units dissolvida em 100 mL de PBS.

- **PBS (Phosphate-buffered saline, pH= 7,2 – 7,4)**

Solução estoque 10X concentrada:

Na₂HPO₄12H₂O (Merck) 42,96g

Na₂HPO₄ 1 H₂O (Merck) 3,6g

NaCl (Merck) 82,0g

H₂O destilada qsp 1000mL

No momento do uso dilui-se o PBS concentrado 20X para 1X em água destilada.

- **DEXTRAN**

Dextran T500 4,5g

NaCl 0,568g

H₂O destilada 100mL

Após o preparo do reagente o mesmo foi autoclavado a 121°C

- **PMA (Forbol 12-myristate 13-acetate) Solução Estoque**

Diluiu-se 5mg de PMA em 1mL de DMSO (Dimethyl Sulfoxide), esta solução foi mantida em freezer -20°C antes do uso.

- **PMA (Forbol 12-myristate 13-acetate) Solução de uso**

Na hora do uso diluiu-se a solução estoque de PMA para 2ug/mL em solução de Hanks 1X

- **Solução de EDTA 0,5mM**

Esta solução foi preparada a partir da solução de EDTA estoque (1mol/l) diluída em solução de Hanks 1X.

- **LIPOPOLISSACARIDEO (LPS de escherichia coli) Solução**

Estoque

Diluiu-se 1mg do reagente LPS em 1ml de solução RPMI 1X e estocou-se em freezer -20⁰C antes do uso.

- **LIPOPOLISSACARIDEO (LPS) Solução de uso**

Na hora do uso diluiu-se a solução estoque a uma concentração de 75ug/mL.

- **CALDO SABOURAUD – DEXTROSE 2%**

Neopeptona 10gramas

Dextrose 20gramas

A neopeptona e Dextrose foram dissolvidas em 800 ml de água destilada, colocadas no agitador magnético a 60°C até atingir o ponto de ebulição dissolvendo por completo, em seguida o volume foi acertado para 1000ml com água destilada, o líquido foi distribuído em frascos esterilizados e autoclavados durante 15 minutos a 121°C. O armazenamento foi em geladeira até a hora do uso.

- **ÁGAR SANGUE**

- **CALDO INFUSÃO CÉREBRO - CORAÇÃO (BHI)**

Anexo V

ESTATÍSTICA

Teste da Dihidrorodamina (DHR) e do Azul de Nitrotetrazolio (NBT) em indivíduos **sadios**

Indivíduos	n		MEAN	MEDIAN	ESTATÍSTICA
Normais	101	DHR S/E	3,26	2,88	Normais DHR S/E X Normais NBT S/E P= 0,8309
Normais	50	NBT S/E	3,65	3	
Normais	101	DHR C/E	89,26	90,75	Normais DHR C/E X Normais NBT C/E P= 0,0001
Normais	50	NBT C/E	98,8	99	

Teste de Dihidrorodamina estimulado com PMA em pacientes com Candidíase Mucocutânea Crônica (CMC), Candidíase Persistente (CP), Doença Granulomatosa Crônica (DGC), portadores de DGC e com Suspeita de Distúrbios de Fagócitos (SDF) em comparação com o grupo controle, expressos em Média de índice de Fluorescência (mif).

C C/E PMA	50		91,27	92,52	C C/E PMA(p= 0,0006)
CMC C/E PMA	9		88,83	87,7	CMC C/E PMA(p= > 0,10)
CP C/E PMA	5		93,1	93,5	CP C/E PMA(p= > 0,10)
Pac DGC C/E PMA	7		10,5	4,65	Pac DGC C/E PMA(p= > 0,10)
Portador DGC C/E PMA	5		58,5	56,5	Portador DGC C/E PMA(p= > 0,10)
SDF C/E PMA	14		70,38	83,49	SDF C/E PMA(p= 0,0076)
					ANOVA (p= <0,001)

ID LPS +Soro AB	7	C/E	73,21	67,1	Normais Soro AB X ID Soro AB (P= 0,2122)
Normais LPS + Soro Autólogo	34	C/E	104,5	102,5	
ID LPS +Soro Autólogo	7	C/E	93,35	103,50	Normais Soro Autólogo X ID Soro Autólogo (P= 0,6032)
Normais Fungo + Soro AB	34	C/E	126,3	128,4	
ID Fungo +Soro AB	7	C/E	101,3	92,9	Normais Fungo + Soro AB X ID Fungo +Soro AB (P=0,0939)
Normais Fungo + Soro Autólogo	34	C/E	115,8	115,3	
ID Fungo +Soro Autólogo	7	C/E	91,6	96,99	Normais Fungo + Soro Autólogo X ID Fungo +Soro Autólogo (P=0,0939)
Normais	34	S/E	37,91	37,88	
CMC	5	S/E	37,93	37,4	Normais S/E X CMC S/E (P= 0,8501)
Normais LPS + soro AB	34	C/E	80,72	83,52	
CMC LPS + Soro AB	5	C/E	76,08	84,5	Normais Soro AB X CMC Soro AB (P= 0,5706)
Normais LPS + soro Autólogo	34	C/E	104,5	103	
CMC LPS + Soro Autólogo	5	C/E	85,77	87,75	Normais Soro Autólogo X CMC Soro Autólogo (P= 0,0246)

Normais Fungo + Soro AB	34	C/E	126,3	128,4	
CMC Fungo +Soro AB	5	C/E	125,4	132,2	Normais Fungo + soro AB X CMC + Fungo + Soro AB (P= 0,7242)
Normais Fungo + Soro Autólogo	34	C/E	104,5	103	
CMC Fungo +Soro Autólogo	5	C/E	85,77	87,75	Normais Fungo + soro autólogo X CMC + Fungo + Soro Autólogo (P= 0,0246))
					ANOVA (p<0,001)

Fagocitose de Bactérias inativadas sem opsonização, com opsonização com soro AB e opsonizadas com soro autólogo

Controle	5		96,16	96,55	
CP + Bactérias sem opsonizar	5		89,49	96,05	C X CP p= (0,9166)
CMC + Bactérias sem opsonizar	3		77,56	94,5	C X CMC p= (0,1429)
					ANOVA p =0,0245
Controle	5		96,58	99,6	
CP + Bactérias opsonizadas com soro AB	5		97,58	98,95	C X CP p= (0,3095)
CMC + Bactérias opsonizadas com soro AB	3		98,63	99	C X CMC p= (0,4534)
Controle	5		98,5	99,1	
CP + Bactérias opsonizadas com soro Autólogo	5		97,66	97,5	C X CP p= (0,4206)
CMC + Bactérias opsonizadas com soro Autólogo	3		88,97	93,3	C X CMC p= (0,0357)

Aderência de Bactérias inativadas sem opsonização, com opsonização com soro AB e opsonizadas com soro autólogo

Controle	5		75	78,7	
CP + Bactérias sem opsonizar	5		76	88,3	C X CP p= (1,000)
CMC + Bactérias sem opsonizar	3		72,97	79	C X CMC p= (0,8413)
Controle	5		69,62	77,7	
CP + Bactérias opsonizadas com soro AB	5		79,18	79,2	C X CP p= (0,7515)
CMC + Bactérias opsonizadas com soro AB	3		64,67	66,1	C X CMC p= (0,8413)
Controle	5		65,84	58,7	
CP + Bactérias opsonizadas com soro Autólogo	5		76,8	81,15	C X CP p= (1,000)
CMC + Bactérias opsonizadas com soro Autólogo	3		70,87	79,5	C X CMC p= (0,7857)

Fagocitose da morte intracelular de bactérias sem opsonizar

Controle	30		96,3	97,15	
CP + Bactérias sem opsonizar	4		54,79	60,18	C X CMC (p=0,0282)
CMC + Bactérias sem opsonizar	5		83,06	85,4	C X CP (p=0,9148)
SDF + Bactérias sem opsonizar	13		50,32	32,02	C X SDF (p=0,0008)

Fagocitose da morte intracelular de bactérias opsonizadas com soro Ab

ANOVA $p=0,0375$

Controle	30		124,2	96,5	
CP + Bactérias opsonizadas com soro AB	5		78,6	85,28	C X CMC ($p=0,4702$)
CMC + Bactérias opsonizadas com soro AB	4		96,02	97,3	C X CP ($p=0,1140$)
SDF + Bactérias opsonizada com soro AB	13		63,12	55,8	ANOVA $p=0,0113$

Fagocitose da morte intracelular de bactérias opsonizadas com soro

Autólogo

Controle	30		69,98	77,45	
CP + Bactérias opsonizadas com soro Autólogo	5		37,8	28,27	C X CMC ($p=0,9573$)
CMC + Bactérias opsonizadas com soro Autólogo	4		71,24	82,9	C X CP ($p=0,0017$)
SDF + Bactérias opsonizadas com soro Autólogo	13		38,77	22,93	C X SDF ($p=0,0002$)

Fagocitose da morte intracelular de fungos sem opsonizaro

Controle	39		90,76	92,2	ANOVA 0,1363 fig 36
CP + fungos sem opsonizar	6		83,69	93,6	C X CMC ($p=0,4115$)
CMC + fungos sem opsonizar	8		92,79	97,6	C X CP ($p=0,6401$)
SDF + fungos sem opsonizar	13		75,62	90,8	C X SDF ($p=0,1254$)

Fagocitose da morte intracelular de fungos opsonizados com soro Ab

Controle	39		90,46	91,2	ANOVA 0,0502 FIG 38
CP + fungos opsonizadas com soro AB	6		93,91	94,8	C X CMC ($p=0,1409$)
CMC + fungos opsonizadas com soro AB	8		92,89	96,3	C X CP ($p=0,2913$)
SDF + fungos opsonizada com soro AB	13		75,2	86,9	C X SDF ($p=0,0643$)

Fagocitose da morte intracelular de fungos opsonizados com soro Autólogo

Controle	39		89,97	89	ANOVA 0,0898
CP + fungos opsonizadas com soro Autólogo	6		94,51	95,4	C X CMC ($p=0,8098$)
CMC + fungos opsonizadas com soro Autólogo	8		89,65	93,15	C X CP ($p=0,2292$)
SDF + fungos opsonizadas com soro Autólogo	13		77,17	85,2	C X SDF ($p=0,0001$)

Morte Intracelular de fungos opsonizados com soro Autólogo

Controle	39		41,4	42,9	ANOVA $p=0,0018$ só ANOVA calc
CP + fungos opsonizados com soro Autólogo	6		20,27	14,59	C X CMC ($p=0,0018$)
CMC + fungos opsonizados com soro Autólogo	8		21,75	19,6	C X CP ($p=0,0203$)
SDF + fungos opsonizados com soro Autólogo	13		39,9	29,14	C X SDF ($p=0,5399$)

Anexo VI

TESTE DA DIHIDRORODAMNIA X AZUL DE NITROTETRAZOLIO
REFERENTE FIGURA 15

Controle sem estímulo	controle com PMA	Controle NBT S/E	C NBT C/PMA
5,18	95,03	0,5	99
1,49	82,48	2,5	98,5
5,73	90,6	4	96
4,98	96,07	4	99
2,12	97,3	5,5	100
2,92	93,7	0,5	99
1,19	93,4	1	99
2,37	85,5	2	99
1,18	92	1,5	99
2,88	90,7	5	99
1,07	85,8	0,5	99,5
5,99	74,4	0	100
0,33	90,25	0	99,5
1,07	88,9	1	99,5
3,32	90,9	3	93
4,33	96,58	5,5	99,5
2,65	69,45	0,5	98,5
1,07	84,4	4	99,5
2,09	72,3	5	99
0,38	93,5	5,5	99
0,44	84,1	5	99,5
2,92	84	1,5	100
2,24	88,45	6,5	99,5
1,67	90,35	3	99,5
1,96	85,65	2,5	98,5
2,42	87,45	8,5	98
0,9	80,7	2,5	99
1,44	92,85	3	100
1,21	78,75	1,5	98,5
3,11	90,05	1	99
0,44	93,1	1,5	98,5
1,24	90,8	4	96
1,35	87,1	0,5	99,5
1,31	82,65	10	100
11,2	94,1	8	100
0,13	90,75	0	99,5
2,54	90,2	7,5	99,5
2,49	88,65	2	100
0,89	87,4	3,5	99,5
1,88	95,8	10	98,5
2,78	89,85	2	100
3,18	94	2,5	100
0,38	95,55	6,5	98,5
1,74	93,5	1	95,5
1,1	87,05	8	100
2,03	97,15	1	96
1,46	95,05	6	99
2,46	85,8	3,5	98
2,34	95,1	3	99
4,56	92,6	15,5	97
0,64	86,2		
3,35	92,45		
1,16	91,05		
4,4	86,4		
2,39	86,35		
1,86	83,75		

continua

Controle sem estímulo	controle com PMA	Controle NBT S/E	C NBT C/PMA
0,62	95,95		
3,9	95,4		
3,99	84,55		
3,89	87,45		
3,69	96		
2,57	90,2		
2,49	92,15		
3,72	93,95		
7	95,1		
5	87,4		
6,2	80,2		
3,61	94,5		
6,18	92,2		
3,9	93,15		
3,69	96,3		
6,09	73,35		
3,83	86,6		
4,61	94,8		
3,55	94,8		
6,36	97,665		
4,46	83,1		
3,33	90,75		
3,48	92,3		
9,58	91,25		
4,79	96,05		
4,51	90,8		
2,51	89,3		
74,2	86,55		
4,72	82,6		
4,51	92,15		
1,19	66,45		
5,99	96,45		
4,14	89,8		
6,24	98,73		
3,51	90,635		
4,55	82,15		
4,07	94,65		
5,85	90,9		
2,79	89,95		
4,82	90,99		
13,62	93,795		
0,06	100		
1,1	81,69		
4,67	66,59		
0,81	99,07		
9,18	75,32		

Anexo VII

Teste de Dihidrorodamina estimulados c/PMA em CMC e CP

Estimulo PMA	Média Intensidade Fluorescencia (MIF)	
Controle	95,95	424
Controle	95,4	955,7292
Controle	87,05	641,3934
Controle	97,15	788,0952
Controle	95,05	817,2043
Controle	96,45	1761,006
Controle	95,1	380,9524
Controle	92,6	673,4234
Controle	92,45	267,0854
Controle	91,05	997,7477
Controle	86,4	198,1675
Controle	85,8	640,5405
Controle	86,35	620,9302
Controle	83,75	586,2694
Controle	95,95	405,1219
Controle	95,4	394,7581
Controle	96	3127,042
Controle	90,2	166,3347
Controle	92,15	1039,548
Controle	93,95	674,7573
Controle	95,1	656,6265
Controle	87,4	533,7838
Controle	80,2	298,7745
Controle	94,5	1924,107
Controle	92,2	743,5424
Controle	87,45	487,0879
Controle	84,55	301,7376
Controle	96,07	320,1177
Controle	90,2	623,15
Controle	96,3	1806,18
Controle	92,15	1039,548
Controle	93,35	208,5409
Controle	95,1	380,9524
Controle	87,4	233,1707
Controle	80,2	298,7745
Controle	92,6	673,4234
Controle	94	580,4878
Controle	92,15	1039,548
Controle	81,69	234,425
Controle	90,99	446,8333
Controle	83,1	337,6506
Controle	90,2	449,1979
Controle	86,55	156,0847
Controle	93,5	315,5844
Controle	94,1	257,09
Controle	96,45	176,118
Controle	87,2	220,2312
Controle	95,03	425,2019
Controle	96,07	320,1177
Controle	93,5	315,5844

continua

CMC

NRSP	87,55	572,6872247
FMS	87,7	138,1578947
PAMS	96,95	879,5731707
MAC	82,55	696,0227273
MRP	91,65	753,0364372
MIVF	83,15	475,9036145
RL	92,95	347,972973
BP	87,35	470,7831325

CP

JPFS	92,2	383,9366516
FMA	91,1	468,12749
AMN	93,5	451,7374517
MLT	94,1	294,9238579
AJM	94,6	416,8367347

Anexo VIII**Teste de Dihidrorodamina estimulados c/PMA em DGC , SDF, Port.DGC**

Controles	estimulado com PMA	MIF
Controles	95,95	424
Controles	95,4	955,7292
Controles	87,05	641,3934
Controles	97,15	788,0952
Controles	95,05	817,2043
Controles	96,45	1761,006
Controles	95,1	380,9524
Controles	92,6	673,4234
Controles	92,45	267,0854
Controles	91,05	997,7477
Controles	86,4	198,1675
Controles	85,8	640,5405
Controles	86,35	620,9302
Controles	83,75	586,2694
Controles	95,95	405,1219
Controles	95,4	394,7581
Controles	96	3127,042
Controles	90,2	166,3347
Controles	92,15	1039,548
Controles	93,95	674,7573
Controles	95,1	656,6265
Controles	87,4	533,7838
Controles	80,2	298,7745
Controles	94,5	1924,107
Controles	92,2	743,5424
Controles	87,45	487,0879
Controles	84,55	301,7376
Controles	96,07	320,1177
Controles	90,2	623,15
Controles	96,3	1806,18
Controles	92,15	1039,548
Controles	93,35	208,5409
Controles	95,1	380,9524
Controles	87,4	233,1707
Controles	80,2	298,7745
Controles	92,6	673,4234
Controles	94	580,4878
Controles	92,15	1039,548
Controles	81,69	234,425
Controles	90,99	446,8333
Controles	83,1	337,6506
Controles	90,2	449,1979
Controles	86,55	156,0847
Controles	93,5	315,5844
Controles	94,1	257,09
Controles	96,45	176,118
Controles	87,2	220,2312
Controles	95,03	425,2019
Controles	96,07	320,1177
Controles	93,5	315,5844

continua

Portador DGC C/E PMA

IMD	74,4	294,37751
SM	52	153,9267016
MM	56,5	187,9873
TJF	24,41	521,347565
D N	85,17	522,9447853
ICV	75,27	406,514733

Pac DGC

PN	1,75	98,65196078
RCSS	0,95	73,06547619
RLR	15,15	51,41129032
TFP	4,655	77,35531629
PM	1,85	167,251462
	10,325	117,114094
RCS	38,79	297,752809
IMFG	36,4	1734,373195

SDF C/E PMA

VNDV	100	7114,856021
LFN	96,305	2893,877551
DQM	21,64	271,94
VX	20,5	201,5208553
GHS	79,16	369,0364277
DC	48,38	214,0608604
GVC	87,78	311,1411574
BBS	87,58	106,6053748
LBS	90,5	260,6583072
LMS	43,05	135,7142857
PRS	88,6	14.892.086
JASF	90,75	222,2972973
VH	51,7	128,8770053
EFS	79,4	156,2211982
BSS	73,8	141,7085427
BTF	38,6	121,5827338
JASF	78,05	135,3092784

Anexo IX

Quimiotaxia de Neutrófilos C X CMC X SDF

Nº Amostra	SEM ESTÍMULO	SORO AB + LPS	SORO AUTÓLOGO + LPS	SORO AB + FUNGO	SORO AUTÓLOGO + FUNGO
CONTROLES					
amostra 1	38,65	71,05	102,35		
amostra 2	35,25	58,5	95,35		
amostra 3	45,95	83,45	104,5		
amostra 4	46,6	77,15	107,4		
amostra 5	30,15	50,45	74,05		
amostra 6	37,61	64,16	89,42		
amostra 7	46,15	86,07	106,79		
amostra 8	40,5	72	128,45		
amostra 9	37,75	67,25	114,35		
amostra10	31,8	54,9	122,1	136	117
amostra 11	31,6	78,05	94,9	129	107,5
amostra 12	32,72	89,6	103,5		
amostra 13	35,16	79,7	121		
amostra 14	41,15	83,6	101,25		
amostra 15	39,1	87,1	98,9		
amostra 16	38,05	95,06	99,1		
amostra 17	33,11	89,9	100,2		
amostra 18	33,73	93	105,1		
amostra 19	35,07	92,5	102,5		
amostra 20	39,62	87,5	100,56		
amostra 21	38,5	99	102,2		
amostra 22	38	99,45	98		
amostra 23	41,02	89	96,5		
amostra 24	45,2	101	101,5		
amostra 25	37,56	85	112,5		
amostra 26	37,4	87,3	105,6		
amostra 27	33,05	88,5	103,4		
amostra 28	44,2	64,1	72,24		
Amostra 29	32,2	97,7	125,9	127,7	122,7
Amostra 30	38,4	78,5	112,4	122,5	104,1
Amostra 31	47,3	69,5	127,2	126,4	139,2
Amostra 32	34,9	67,1	101,9	145,3	113,5
Amostra 33	69,7	81,7	117,3	138,9	128,9
Amostra 34	32,2	75,7	105,1	84,2	93,5

CMC

Amostra FMS	55,8	88,1	59,92	107	64,32
Amostra BP	40,6	72,7	87,75	132,2	70,4
Amostra NRS	33,2	48,1	84,5	135,4	111,5
Amostra MRP	20,65	87	89,5	119,2	51,1
Amostra MIV	36,5	84,5	107,2	133,4	66,1

SDF

Amostra GH	37,4	93	119,4	92,5	91,6
Amostra DC	55	64,5	72,3	92,9	84,4
Amostra DQ	34,9	67,1	101,9	113,5	145,3
Amostra L C	36,8		102,1		95,3
Amostra LC	42,3	69	125,5	124,2	107,3
Amostra RX	25,6	66,9	69,1	142	111
Amostra VX	32,9	59	34,2	51,8	47,7

Anexo X**Fagocitose e Aderência de Bactérias S.aureus**

NOME	% Fagocitose de bactérias sem opsonização	% aderência de bactérias sem opsonização	% Fagocitose de Bactérias opsonizadas com soro AB	% aderência de bactérias opsonizadas com soro AB	% Fagocitose de Bactérias opsonizadas com soro soro autólogo	% adderência de Bactérias opsonizadas com soro Autólogo
Controle	96,9	78,7	98,6	45	98,5	38,1
MRP (CMC)	94,6	79	99	66,1	93,3	79,5
MLT (CMC)	97,3	87,3	98,6	57,6	95,6	85,9
Controle	99,5	86,6	99,7	79	99,8	90,6
AMN(CP)	98	77,9	98,7	76,1	97,6	76,3
GTOZ (CP)	99,3	88,3	97,5	79,2	99,3	86
Controle	99,3	63,3	99,5	50,3	99,2	58,7
FMS (CMC)	70,6	52,6	98,3	70,3	78	47,2
Controle	99,6	98,1	99,4	96,1	99,1	96,8
FMA (CP)	98,8	95,5	99,2	97	98,2	n teve
JFS (CP)	99,8	97,2	96,1	90,7	97,5	96,2
Controle	96,2	48,3	85,7	77,7	95,8	45
JPFS (CP)	97,8	21,1	96,4	52,9	97,4	48,7

Anexo XI**Média de Intensidade de Fluorescência de Fagocitose de Bactérias S.aureus**

Nome	MIF de bactérias sem opsonização	MIF de Fagocitose de Bactérias opsonizadas com soro AB	MIF de Fagocitose de Bactérias opsonizadas com soro soro autólogo
Controle	1431,818182	1434,659091	1784,090909
MRP (CMC)	580,1104972	708,5635359	733,4254144
MLT (CMC)	525,8426966	515,7303371	461,7977528
Controle	854,7468354	717,0886076	757,5949367
AMN (CP)	595,1048951	502,7972028	588,8111888
GTOZ (CP)	578,921011	598,23111	579,44993
Controle	376,498801	166,6666667	299,7601918
FMA(CP)	369,2640693	202,1645022	384,4155844
JFS (CP)	334,5537346	370,9872703	347,0058477
Controle	1222,222222	298,6666667	116
JPFS (CP)	734,6437346	170,2702703	847,6658477
Controle	513,90988	576,092211	582,012998
FMS (CMC)	426,5232975	282,078853	288,5304659

Anexo XII

Fagocitose e aderência de fungos *Candida albicans*

NOME	% Fagocitose de Fungos s/opsonização	% Fungos s/opsonização aderidos nas células	% Fagocitose de Fungos opsonizados c/soro AB	% Fungos opsonizados c/soro AB aderidos nas células	% Fagocitose de Fungos opsonizados soro autólogo	% Fungos opsonizados c/soro Autólogo aderidos nas células
Controle	82,3	78,7	92,2	45	97,4	38,1
MLT (CMC)	92,6	79	95,4	66,1	98,2	79,5
Controle	99,5	86,6	95,7	79	90,7	90,6
MIV (CMC)	93,9	87,3	93,5	79,2	94,4	85,9
Controle	92,5	63,3	99,8	50,3	96,1	58,7
AMM (CP)	99,7	77,9	99,7	76,1	99,8	76,3
FM A (CP)	99,6	88,3	99,2	79,2	99,5	86
Controle	94,8	98,1	95,7	96,1	99,9	96,8
FMS (CMC)	88,2	52,6	92	70,3	92,9	47,2
NRP (CMC)	99,3	69	99,4	71,20	99,6	71,4
Controle	98,8	48,3	99,2	77,7	99,3	45
JFS (CP)	88,9	95,5	99,3	97	99,4	96,2
Controle	99,2	71,25	99,1	76,5	99,3	72,2
JPFS (CP)	95,6	97,2	89	90,7	99,5	48,7
Controle	98,9	75,5	84,6	74,5	98,8	75,6
LMS (CP)	96,3	21,1	87,2	52,9	98,7	64

Anexo XIII

Média de Intensidade de Fluorescência da Fagocitose e Aderencia de
Fungos inativados

NOME	MIF de Fagocitose de Fungos s/opsonização	MIF de Fagocitose de Fungos opsonizados c/soro AB	MIF de Fagocitose de Fungos opsonizados soro autólogo
Controle	711,8971061	721,2736637	136,3466283
MLT (CMC)	529,3209877	433,3333333	565,7407407
Controle	121,3389121	129,2887029	306,6945607
MIV (CMC)	183,2987552	149,4813278	213,6929461
Controle	428,7572254	343,2080925	394,7976879
AMM (CP)	205,6218905	154,9751244	223,9303483
FMA (CP)	10371,28713	8722,772277	127,970297
LBS	152,9069767	128,4883721	136,4651163
Controle	1518,134715	443,5233161	126,4248705
FMS (CMC)	115,5339806	113,592233	106,7961165
NRSP (CMC)	155,4404145	109,8445596	140,4145078
Controle	152,9069767	128,4883721	136,0465116
JFS (CP)	155,4404145	109,8445596	140,4145078
Controle	912,2137405	805,3435115	870,2290076
JPFS (CP)	603,0746706	397,9502196	575,0263543
Controle	529,3209877	433,3333333	565,7407407
LMS (CP)	244,3514644	251,0460251	259,832636

Anexo XIV

Fagocitose e Morte intracelular de bactérias sem opsonizar, bactérias opsonizadas com soro AB e bactérias com soro autólogo

NOME	% Fagocitose de bactérias sem opsonização	% Morte de bactérias sem opsonização	% Fagocitose de Bactérias opsonizadas com soro AB	% Morte de bactérias opsonizadas com soro AB	% Fagocitose de Bactérias opsonizadas com soro soro autólogo	% Morte de Bactérias opsonizadas com soro Autólogo
Controle	98,20	76,00	92,30	91,40	88,30	82,40
Amostra PAMS CMC	98,50	98,10	99,20	97,30	99,70	96,20
Amostra NRSP CMC	11,50	85,40	99,00	82,90	99,10	98,00
Controle	97,40	37,27	91,80	97,90	97,60	98,60
Amostra FMS CMC	88,80	71,19	91,50	74,80	61,00	75,40
Controle	98,10	75,30	99,50	83,69	95,90	99,96
Amostra BP CMC	94,50	95,60	97,30	86,90	97,60	15,80
Amostra MAC (CMC)	94,5	65	93,1	14,3	66,1	43,1
Controle	94,60	84,10	98,40	82,20	97,70	87,64
Amostra LMS CP	99,10	30,60	39,90	54,30	66,20	61,90
Amostra JPFS CP	96,20	88,60	88,90	91,20	92,60	89,50
Controle	95,10	65,24	96,50	77,20	99,70	88,00
Amostra FMA CP	93,10	74,20	98,40	39,90	66,10	60,90
Amostra JFS CP	98,50	65,00	93,10	14,30	38,90	43,10
Controle	95,04	76,09	98,50	74,10	98,10	77,50
Amostra JDP SDF	50,35	27,08	33,63	23,63	27,66	20,62
Amostra VDP SDF	35,12	55,36	43,68	50,08	43,06	40,96
Controle	99,38	99,36	95,60	98,74	99,16	99,06
Amostra LFN SDF	99,21	99,21	99,20	99,24	98,92	98,80
Amostra EFN SDF	99,26	99,94	99,06	99,06	99,42	99,40
Controle	93,10	84,30	94,90	96,10	52,48	58,70
Amostras BCL SDF	51,97	32,02	55,80	22,93	34,86	21,00
Amostra LCL SDF	27,11	23,19	52,14	18,32	39,52	40,96
Controle	95,04	75,30	98,76	77,70	79,00	65,30
Amostra GTOZ SDF	95,90	55,36	69,65	16,64	87,12	21,00
Controle	98,20	87,50	95,16	85,10	86,50	75,50
Amostra JASF SDF	39,18	17,32	59,26	14,52	28,80	19,69
Amostra AJM CP	54,16	14,98	81,66	10,48	86,20	14,88
Controle	90,50	83,40	98,40	79,20	92,12	84,20
Amostra PN DGC	92,7	2,26	97,48	1,66	94,22	0,62

continua

NOME	% Fagocitose de bactérias sem opsonização	% Morte de bactérias sem opsonização	% Fagocitose de Bactérias opsonizadas com soro AB	% Morte de bactérias opsonizadas com soro AB	% Fagocitose de Bactérias opsonizadas com soro soro autólogo	% Morte de Bactérias opsonizadas com soro Autólogo
Controle	87,60	77,00	85,70	51,62	88,20	86,00
Amostra VX SDF	35,82	20,64	43,68	6,64	38,9	4,88
Amostra RX SDF	88,2	78,08	81,66	14,52	87,32	27,8
Controle	97,40	59,60	96,50	54,54	97,00	58,70
Amostra RC DGC	95,9	0,75	94,6	0,59	96,2	0,37
Controle	98,10	24,40	98,50	30,80	98,60	31,10
Controle	94,60	17,05	77,53	39,62	99,20	38,21
Controle	95,10	18,96	95,60	44,06	89,00	44,02
Controle	95,04	27,08	94,90	82,20	95,14	92,20
Controle	98,78	54,24	95,16	79,90	98,10	75,00
Controle	96,90	76,00	98,85	77,20	97,00	90,60
Controle	99,50	24,40	98,60	30,80	99,90	37,20
Controle	99,30	55,20	99,70	50,00	95,90	52,10
Controle	99,60	57,53	99,50	53,54	95,14	54,17
Controle	96,20	63,18	99,40	79,10	98,68	50,31
Controle	99,15	71,09	97,50	42,10	98,60	45,00
Controle	95,40	48,10	90,00	97,50	99,80	47,44
Controle	95,20	51,90	78,70	45,00	99,20	48,86
Controle	90,70	67,10	980,70	79,00	99,10	78,21
Controle	99,50	39,80	99,50	50,30	95,80	38,10
Controle	99,35	73,00	89,20	69,00	99,30	65,30
Controle	92,80	58,19	90,16	99,70	99,50	96,80

Anexo XV

Fagocitose e Morte intracelular de bactérias sem opsonizar, bactérias opsonizadas com soro AB e bactérias com soro autólogo

NOME	MIF Morte de bactérias sem opsonização	MIF Morte de bactérias opsonizadas com soro AB	MIF Morte de Bactérias opsonizadas com soro Autólogo
Controle	141,6666667	110,1190476	149,4047619
Amostra PAMS CMC	119,4570136	959,2760181	950,2262443
Amostra (NRSP CMC	580,1104972	708,5635359	733,4254144
Controle	143,1818182	143,4659091	178,4090909
Amostra FMS CMC	525,8426966	515,7303371	461,7977528
Controle	854,7468354	717,0886076	757,5949367
Amostra BP CMC	472,3484848	409,4697	126,1363636
Amostra MAC (CMC)	897,1428571	257,14286	101,1428571
Controle	376,498801	166,6666667	299,7601918
Amostra LCM CP	107,6335878	78,6259542	91,60305344
Amostra JPFS CP	734,6437346	770,2702703	847,67
Controle	503,515625	456,25	429,6875
Amostra MLT CMC	525,8427	515,7303371	461,79775
Controle	580,4597701	536,49425	676,8678161
Amostra FMA CP	618,0076628	517,6245211	530,65
Amostra JFS CP	291,8205805	347,49	264,6437995
Controle	342,8282828	450,1010101	414,5454545
Amostra PN DGC	140,3030303	135,75758	113,030303
Controle	897,1428571	257,14286	101,1428571
Amostra RC DGC	617,1180932	634,0195	583,531961
Controle	174,9815498	136,16236	144,1661247
Amostra VDP SDF	169,5338779	107,97693	35,51684468
Controle	660,9195402	150,57471	629,3103448
Controle	222,8353522	229,43024	203,5477122
Amostra LFN SDF	232,246244	222,53573	227,3978479
Amostra EFN SDF	169,2744324	147,77887	42,02901136
Controle	172,574178	211,14675	171,018496
Amostra BCL SDF	167,6140119	186,71514	12,65564248
Amostra LCL SDF	78,25950361	93,590952	29,65030211
Controle	232,8630705	202,2821577	1370,124481
Amostra GTOZ SDF	206,8589744	286,794872	188,33
Controle	146,6487936	184,9865952	541,5549598
Amostra JASF SDF	115,1125402	119,57842	26,90284733
Amostra AJM CP	375,625	306,35417	220,5290717
Controle	295,8246347	244,6764092	211,691023
Amostra VX SDF	140,3030303	135,75758	113,030303
Amostra RX SDF	98,25950361	99,79	33,590952
Controle	900	959,8173516	734,7031963
Controle	183,5120643	79,72227904	180,2507426
Controle	289,048474	343,0879713	305,7450628
Controle	803,030303	690,1515152	442,8030303
Controle	648,7341772	576,2658228	585,443038
Controle	146,0227273	197,7272727	135,7954545
Controle	317,4157303	205,2247191	387,5842697
Controle	238,7820513	209,6153846	197,5641026
Controle	255,511811	180,3937008	235,8267717
Controle	618,0076628	517,6245211	530,651341
Controle	394,30	365,10	390,89
Controle	598,3193277	539,4958	657,5630252
Controle	401,8018018	345,9459459	518,4684685
Controle	148,7755102	122,8571429	147,755102
Controle	170,5	188,75	136,5

Anexo XVI

Fagocitose e Morte intracelular de Fungos sem opsonizar, Fungos opsonizados com soro AB e Fungos com soro autólogo

NOME	% Fagocitose de fungos sem opsonização	% Morte de fungos sem opsonização	% Fagocitose de fungos opsonizados com soro AB	% Morte de fungos opsonizados com soro AB	% Fagocitose de fungos opsonizados com soro soro autólogo	% Morte de fungos opsonizados com soro Autólogo
Controle	98,9	41,5	99,1	46,4	98,8	47
Amostra MRP CMC	84,4	13,6	94,3	16,3	85,8	18,3
Controle	79,4	25,3	78,1	24,85	85,7	24,01
Amostra FMS CMC	80,1	19,61	68,4	14,94	66	14,27
Controle	99,1	12,6	99	17,5	99,4	14,1
Amostra BP CMC	99,3	17,4	99,5	12,10	89	13,1
Amostra MAC CMC	98,9	16,8	98,3	12,9	97,6	14,9
Controle	98,2	17,6	98,9	27,8	99,3	26,8
Amostra LMS CP	95,2	15	97,4	24,3	97,3	30,4
Amostra AJM CP	98,1	11,6	99,1	18,8	92,8	11,1
Controle	96,5	11	97,6	18,6	98	18,1
Amostra MIVF CMC	98,5	8,68	98,8	98,8	98,7	7,61
Controle	98,5	27,2	99,2	22,6	99,3	25
Amostra PAMS CMC	98,1	21,8	98,7	23,3	98,8	20
Amostra FMA CP	82,3	6,85	92,2	15,2	97,4	13,8
Controle	95,5	14,9	96,1	21,2	97,2	28,3
Amostra JASF SDF	93,7	16	94,8	27,7	95,4	25,4
Controle	80,5	42,69	89,4	41,7	88	49,9
Amostra JPFS CP	32,8	1,98	90,6	14,2	86,4	7,59
Controle	98	22,92	99,4	20,02	95,6	28,08
Amostra NRSP CMC	85,9	6,69	92,5	6,14	84	8,10
Controle	93,7	50,2	90,4	61,3	95,5	69,3
Amostra RL CMC	97,1	50,6	92,6	59,06	97,3	65,9
Amostra JFS CP	93,6	47,12	88,5	41,9	94,9	42,2
Controle	88,8	85,8	92,1	85,9	89	86
Paciente BC SDF	99,21	99	99,2	99,24	98,92	98,88
Paciente LC SDF	99,26	99,94	99,06	99,06	99,42	99,4
Controle	89	29,9	86,8	47	84,8	36,9
Paciente RCS DGC	70,3	1,34	60,24	0,86	68,74	0,35
Paciente MLT CP	93,7	62,8	95,9	69,7	92,9	63,9

continua

Controle	86,1	28,4	91,2	45	91	42,9
Paciente VX SDF	14,92	2,14	11,76	10,44	34,28	10,68
Paciente RX SDF (Mãe VX)	47,84	16,92	52,32	19,66	67,12	26,6
NOME	% Fagocitose de fungos sem opsonização	% Morte de fungos sem opsonização	% Fagocitose de fungos opsonizados com soro AB	% Morte de fungos opsonizados com soro AB	% Fagocitose de fungos opsonizados com soro soro autólogo	% Morte de fungos opsonizados com soro Autólogo
Controle	91,2	20,6	88,7	25,9	85,4	20,3
Paciente LFN SDF	86,52	33,76	80,52	23,78	82,18	29,36
Paciente EFN SDF (Mãe LFN)	95,22	27,76	92,1	22,38	87,74	27,62
Controle	92,2	28,4	91,2	45	91	42,9
Paciente MACQ SDF	59,04	21,64	50,86	20,86	58,43	29,14
Paciente DQ SDF	43,56	8,91	44,23	14,4	43,09	15,02
Controle	99,5	87,1	99,8	78,8	99,9	85,2
Paciente AGC SDF (Pai LC)	99,2	68,9	99,2	58,2	99,3	64,2
Paciente LC SDF	90,8	41	86,9	43,2	85,2	40,3
Paciente GTOZ CP	93	69,2	89,7	68,4	91,5	75,23
Controle	94,8	27,4	95,7	35,8	96,1	27,6
Paciente PN DGC	15,3	0	60,4	4,02	72,5	1,93
Controle	82,5	26,6	74,6	26,3	90,7	22,6
Paciente GVCG	60,8	24,02	75,86	20,26	63,18	28,72
Controle	99,5	16,7	99,2	16,6	96,4	19,1
Controle	98,8	11,9	98,3	12	99,3	52,5
Controle	88,1	61,48	82,8	62,63	86,9	63,49
Controle	84	20,6	88,7	25,9	85,4	20,3
Controle	80,2	30,28	80	35,93	87	35,13
Controle	89	15	76,4	20,8	87,1	15,3
Controle	85,9	19,7	85,4	16,1	88	21,04
Controle	83,4	18,79	60	18,43	86,4	21,7
Controle	81,5	14,5	84,8	18,9	80,5	16,1
Controle	95,4	34,06	94,2	34,41	93,1	44,98
Controle	93	65,8	89,09	68,4	87,2	41,8
Controle	97	45,12	91,7	57,3	89,6	59,1
Controle	85,67	32,1	89	48,34	88,9	48,9
Controle	99,4	62,5	95,9	72,9	71,89	82,09
Controle	79,4	35,4	83,16	42,15	82	42,9
Controle	95,4	54,06	94,2	54,41	93,1	54,98
Controle	97	45,12	91,7	57,3	89,6	59,1
Controle	85,67	32,1	89	48,34	88,9	48,9
Controle	99,4	62,5	95,9	72,9	71,89	82,09
Controle	79,4	35,4	83,16	42,15	82	42,9
Controle	80	46,53	88,2	46,55	85,1	47,25

Anexo XVII

Média de índice de Fluorescência de Fagocitose e Morte intracelular de Fungos sem opsonizar, Fungos opsonizados com soro AB e Fungos com soro autólogo

NOME	MIF Morte de fungos sem opsonização	MIF Morte de fungos opsonizados com soro AB	MIF Morte de fungos opsonizados com soro Autólogo
Controle	371,7948718	558,974359	484,615385
Amostra MRP CMC	110,8401084	122,2222222	126,5582656
Controle	345,1834862	334,8623853	300,458716
Amostra FMS CMC	112,254902	198,2352941	222,6470588
Controle	474,3276284	596,5770171	502,200489
Amostra BP CMC	466,3716814	386,5044248	421,017699
Amostra MAC CMC	537,6623377	672,7272727	759,307359
Controle	412,2807	6333,333333	553,884712
Amostra LMS CP	61,41078838	77,17842324	64,3153527
Amostra AJM CP	120,8776596	155,7180851	146,808511
Controle	463,7755102	575,5102041	577,55102
Amostra MIVF CMC	211,7171717	341,4141414	1664,64646
Controle	494,2307692	333,5858586	338,383838
Amostra PAMS CMC	508,1081081	513,5135135	584,6846847
Amostra FMA CP	52,20264317	215,8590308	156,387665
Controle	264,393934	481,9230769	546,153846
Amostra JASF CP	250,7317073	546,3414634	326,829268
Controle	183,5243553	257,3065903	254,584527
Amostra JPFS CP	128,3972	130,2787	141,01045
Controle	517,4757282	927,184466	916,504854
Amostra NRSP CMC	678,1609195	637,4384236	743,842365
Controle	256,98201	293,3135215	278,0089153
Amostra RL CMC	187,7314815	171,0648148	115,2777778
Amostra JFS CP	244,5887446	183,7662338	179,2207792
Controle	289,9408284	262,0253165	277,21519
Amostra BC SDF	183,856502	177,5784753	195,9641256
Amostra LC SDF	254,177308	204,0131339	228,0554542
Controle	377,3291925	392,8571429	381,987578
Amostra MLT CP	396,437	392,16152	334,9168
Amostra RCS DGC	255,162432	240,7204889	221,1000322
Controle	589,8734177	476,9654088	525,3144654
Amostra VX SDF	166,9756	165,4032258	163,33513
Amostra RX SDF	163,697734	137,6770538	165,7957224
Controle	411,585366	527,4390244	356,7073171
Amostra LFN SDF	282,3529412	297,6470588	278,8235294
Amostra EFN SDF	474,3276284	596,5770171	202,200489
Controle	184,745763	229,5399516	394,6731235
Amostra MCQ SDF	136,9856	125,4032258	133,3333333
Amostra DQ SDF	103,597734	97,67705382	105,6657224
Controle	236,781609	231,0344828	219,1570881
Amostra AGC SDF	257,667526	239,6907216	293,2345361
Amostra LC SDF	179,690832	201,119403	219,3496802
Amostra GTOZ CP	103,795812	110,8202443	110,6457243
Controle	470,914127	310,2493075	581,7174515
Amostra PN DGC	213,836478	278,8259958	179,245283
Controle	588,0958867	513,7019886	422,7186053
Amostra GVCG SDF	393,8891638	180,0593765	92,80059377
Controle	287,323944	417,1597633	276,627219
Controle	129,59155	147,6056338	164,5070423
Controle	561,006289	581,9224515	536,90165

continua

NOME	MIF Morte de fungos sem opsonização	MIF Morte de fungos opsonizados com soro AB	MIF Morte de fungos opsonizados com soro Autólogo
Controle	349,925706	335,2112676	270,1408451
Controle	601,213697	607,4122237	601,3003901
Controle	149,978251	169,5084819	183,4710744
Controle	193,4640523	2491,8301	3117,647059
Controle	183,5243553	257,3065903	254,5845272
Controle	788,9784946	793,4535215	778,23583
Controle	435,2380952	644,7619048	703,809524
Controle	883,5260116	839,5953757	105,2023121
Controle	592,7419355	532,2580645	580,6451613
Controle	100,7717042	106,1093248	114,2122186
Controle	414,4444444	388,0555556	380,2777778
Controle	108,5828343	101,1976048	598,8023952
Controle	145,9509202	143,404908	116,5030675
Controle	839,2370572	484,9642857	655,7183887
Controle	205,5555556	128,4324324	190,7617845
Controle	714,2857143	814,8	590,3289151
Controle	933,4365325	689,9237148	905,8972559
Controle	103,5897436	484,6039604	309,5311063
Controle	2019,287834	152,3039275	193,6038275

Anexo XVIII

Dosagem de CH 50 (Via clássica)

Amostras	CONTROLE	CP	CMC
Amostra 1	137	35	35
Amostra 2	137	21	35
Amostra 3	109	23	16
Amostra 4	109	32	22
Amostra 5	123	30	13
Amostra 6	75	24	
Amostra 7	131	26	
Amostra 8	135	38	
Amostra 9	122	23	
Amostra 10	126		
Amostra 11	149		
Amostra 12	149		
Amostra 13	128		
Amostra 14	150		
Amostra 15	113		
Amostra 16	96		
Amostra 17	128		
Amostra 18	145		
Amostra 19	89		
Amostra 20	148		
Amostra 21	125		
Amostra 22	141		
Amostra 23	141		
Amostra 24	56		
Amostra 25	137		
Amostra 26	95		
Amostra 27	123		
Amostra 28	144		
Amostra 29	107		
Amostra 30	88		

continua

Amostras	CONTROLE	CP	CMC
Amostra 1	137	35	35
Amostra 2	137	21	35
Amostra 3	109	23	16
Amostra 4	109	32	22
Amostra 5	123	30	13
Amostra 6	75	24	
Amostra 7	131	26	
Amostra 8	135	38	
Amostra 9	122	23	
Amostra 10	126		
Amostra 11	149		
Amostra 12	149		
Amostra 13	128		
Amostra 14	150		
Amostra 15	113		
Amostra 16	96		
Amostra 17	128		
Amostra 18	145		
Amostra 19	89		
Amostra 20	148		
Amostra 21	125		
Amostra 22	141		
Amostra 23	141		
Amostra 24	56		
Amostra 25	137		
Amostra 26	95		
Amostra 27	123		
Amostra 28	144		
Amostra 29	107		
Amostra 30	88		
Amostra 31	156		
Amostra 32	133		
Amostra 33	92		
Amostra 34	156		
Amostra 35	118		
Amostra 36	103		
Amostra 37	141		
Amostra 38	122		
Amostra 39	107		

continua

Amostras	CONTROLE	CP	CMC
Amostra 40	100		
Amostra 41	74		
Amostra 42	146		
Amostra 43	146		
Amostra 44	105		
Amostra 45	106		
Amostra 46	137		
Amostra 47	120		
Amostra 48	87		
Amostra 49	72		
Amostra 50	90		
Amostra 51	84		
Amostra 52	72		
Amostra 53	99		
Amostra 54	90		
Amostra 55	67		
Amostra 56	64		
Amostra 57	110		
Amostra 58	102		
Amostra 59	71		
Amostra 60	112		