**COMPARAÇÃO DOS TESTES “NITROBLUE TETRAZOLIUM” E “DIHYDRORHODAMINA 123” PARA ESTUDO DO SISTEMA NADPH OXIDASE FAGOCÍTICO HUMANO**

Leticia Hack1, Stéfanne Bortoletto1, Nicolli Gasparin2, Caroline Kael2, Ana Carolina Irioda3, Carolina Cardoso de Mello Prando4

1.Biomédica pela Faculdades Pequeno Príncipe. Mestranda pelo Programa de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Curitiba, Paraná, Brasil

2.Acadêmica do 4º período do Curso de graduação em Biomedicina e Farmácia das Faculdades Pequeno Príncipe – FPP, Curitiba, Paraná, Brasil

3.Bióloga pela Universidade Tuiuti do Paraná. Doutoranda pelo Programa de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Curitiba, Paraná, Brasil

4.Doutora em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas. Pesquisadora, Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe. Docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdades Pequeno Príncipe. Médica especialista em Alergia e Imunologia, Hospital Pequeno Príncipe (HPP). Curitiba, Paraná, Brasil

**RESUMO**

O sistema NADPH oxidase, composto das subunidades p47phox, p67phox, p40phox, p22phox e gp91phox e proteínas reguladoras, é responsável pela produção de reativos do oxigênio a partir da transferência de um elétron para o oxigênio molecular. Este sistema é responsável pela degradação do microrganismo após a sua ingestão por fagocitose. Mutações nos genes que codificam as diferentes subunidades deste sistema caracterizam uma imunodeficiência primária, a Doença Granulomatosa Crônica (DGC). Em 1957 e 1958 foram descritos os primeiros pacientes, meninos que apresentavam hipergamaglobulinemia, linfadenite supurativa, hepatoesplenomegalia e infiltrado pulmonar, com granulomas em diferentes tecidos de biópsia e autópsia. Em 1967, Quie et col. mostraram que a fagocitose era normal nas células de pacientes com quadro clínico e laboratorial semelhante, porém a capacidade de digestão dos microrganismos nestas células estava prejudicada. Cerca de 10 anos depois, Dilworth e Mandell estudaram 4 meninos e demonstraram ausência na produção de reativos do oxigênio pela técnica de redução do NBT em fagócitos. Os principais microrganismos responsáveis pelas infecções na DGC incluem o Bacilo de Calmette-Guérin, micobactérias, bactérias catalase-positivas e fungos. A incidência da DGC é de aproximadamente 1:250.000 nascidos vivos, com padrão de herança ligado ao X (*CYBB*) ou autossômica recessiva (*CYBA*, *NCF1*, *NCF2* ou *NCF4*). O diagnóstico é realizado com base na observação da falha de produção de reativos de oxigênio em células fagocíticas, sendo comprovado pela identificação da mutação em genes do sistema. O teste do NBT e o teste do DHR são técnicas utilizadas na avaliação funcional do sistema NADPH e permitem a identificação tanto de pacientes quanto de mulheres portadoras da forma ligada ao X. O NBT é um teste qualitativo no qual as células fagocíticas estimuladas com forbol miristato acetato (PMA) devem produzir ânion superóxido que reduzir o corante NBT na forma de grânulos azulados no interior das células, o que pode ser visualizado em microscópio óptico. A redução de 5% ou menos do corante sugere o diagnóstico de DGC. Em mulheres portadoras da forma ligada ao X pode-se observar um grupo de células com redução do corante e outro grupo sem a redução. Já o DHR avalia a formação do H2O2 após o estímulo das células com PMA. O contato do H2O2 com o DHR emite fluorescência, que é então quantificada por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em curvas de acordo com a intensidade média de fluorescência (MFI) emitida pelo conjunto de células, em escala logarítmica. Visto que a fluorescência cresce temporalmente, há deslocamento da curva para maior intensidade de fluorescência em indivíduos normais. Caso contrário, não haverá deslocamento da curva, determinando diagnóstico de DGC. Em se tratamento de mulher portadora observa-se uma curva com dois picos, um deles correspondendo ao grupo de células normais e outro ao grupo de células com a mutação. O presente trabalho tem como objetivo apresentar os resultados dos testes NBT e DHR para o diagnóstico de DGC. Foi avaliado um paciente do sexo masculino, quatro meses de vida, com histórico de duas pneumonias graves neste período. No histórico familiar um irmão foi a óbito aos 45 dias de vida, por pneumonia. Foi realizado o teste NBT, onde verificou-se ausência da redução do corante NBT nas células do paciente aderidas à lâmina após estímulo de 30 minutos com PMA a 40ng/ml. Para a mãe deste menino, as células apresentavam-se em padrão de portadora. O teste do DHR revelou ausência da emissão de fluorescência por monócitos e neutrófilos, após 30 minutos de estímulo com PMA a 90nM. Da mesma forma que no teste do NBT, para a mãe deste menino foram observados dois padrões de resposta ao PMA, sendo uma população de células com emissão de fluorescência em níveis semelhantes ao controle normal, e outra população de células sem resposta ao estímulo. Assim, além de estabelecer o diagnóstico funcional de DGC para o paciente, determinamos que a mãe é portadora da mutação em um dos seus cromossomos X, determinando também o padrão de transmissão da doença. Embora o teste do DHR possa ser considerado mais objetivo e qualitativo do que o NBT, e permita o diagnóstico de formas variantes de DGC, ele requer investimento em equipamentos sofisticados e equipe com treinamento técnico para citometria de fluxo. O NBT está sujeito à adesão das células na lâmina e subjetividade do observador ao microscópio. Porém, é um método simples, de baixo custo e para o qual não é necessário investimento em equipamentos e reagentes sofisticados. Conforme observado na literatura e no caso aqui descrito o NBT é um método eficaz para o diagnóstico de DGC e por suas características permitiria a implantação em centros economicamente menos favorecidos, oferecendo a oportunidade de disseminação do diagnóstico para crianças com quadro clínico sugestivo de DGC e seus familiares.

**Palavras-chave:** Doença Granulomatosa Crônica; Nitroblue Tetrazolium; Dihidrorodamina 123.

**REFERÊNCIAS**

CONLEY, M.E., NOTARANGELO, LD, Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin. Immunol.,* v.93, n.1, p.190-197, 1999.

OCHS, I.R. *The NBT slide test: a simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers.* J. Pediatr., v.83, n.1, p.77-82, 1973.

OLIVEIRA-JUNIOR, E.B., *et al*. [*Clinical and Genotypic Spectrum of Chronic Granulomatous Disease in 71 Latin American Patients: First Report from the LASID Registry.*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185101)Pediatr. Blood Cancer, v.62, n.12, p.2101-2107, 2015.

PRANDO, C. *et al*. Aspectos clínicos de pacientes sob suspeita de defeito fagocitário. Rev. bras. alerg. imunopatol., v.28, n.4, p.187-193, 2005.