

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

RAFAEL ESPÓSITO DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS EM CIAS1 EM
PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE CRIOPIRINOPATIA SEM MUTAÇÃO
GERMINATIVA EM NLRP3 (CIAS1)**

Recife

2017

RAFAEL ESPÓSITO DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS EM CIAS1 EM
PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE CRIOPIRINOPATIA SEM MUTAÇÃO
GERMINATIVA EM NLRP3 (CIAS1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Crovella

Coorientador: Prof. Dr. João Bosco de Oliveira Filho

Recife

2017

Catálogo na fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Lima, Rafael Espósito de

Avaliação da frequência de mutações somáticas em CIAS1 em pacientes com suspeita clínica de criopirinopatia sem mutação germinativa em NLRP3 (CIAS1) / Rafael Espósito de Lima. – 2017.

40 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Crovella.

Coorientador: Prof. Dr. João Bosco de Oliveira Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2017. Inclui referências e anexos.

1. Doenças hereditárias. 2. Genética médica I. Crovella, Sérgio (orient.). II. Oliveira Filho, João Bosco de (coorient.) III. Título.

616.042

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 257

RAFAEL ESPÓSITO DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS EM CIAS1 EM
PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE CRIOPIRINOPATIA SEM MUTAÇÃO
GERMINATIVA EM NLRP3 (CIAS1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em: 14 / 03 / 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Crovella (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. João Bosco de Oliveira Filho (Coorientador)

Genomika Diagnósticos

Prof. Dr. Rodrigo Bertollo de Alexandre (Examinador Externo)

Genomika Diagnósticos

Com muito amor aos meus pais, Jaime (*in memoriam*) e

Margarida Espósito.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a *Deus, Ser Onipotente*, por tudo que já realizou em minha vida, e por proporcionar essa oportunidade e alegria por chegar até este momento.

Aos meus pais, *Jaime Espósito (in memoriam) e Margarida Espósito*, por todo amor, zelo, carinho que a mim dedicaram, bem como por todo sacrifício realizado para que eu chegasse a este momento.

Aos meus irmãos, *Jaime e Rafaela*, pela confiança que depositaram em mim e por estarem sempre presentes em minha vida nos momentos mais difíceis. A minha namorada, *Edlane Suélen*, e ao meu afilhado, *Cleyton Filho*, por tornarem meus dias mais alegres e pelo apoio e paciência.

Ao Professor *Sérgio Crovella*, meu orientador, por toda paciência, dedicação, carinho e confiança depositada em mim para realização deste projeto.

Ao meu orientador, Dr. *João Bosco de Oliveira Filho*, por nunca duvidar da minha capacidade e pela oportunidade que sempre me foi dada, desde o começo, para que pudesse crescer profissionalmente.

À Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, *Prof. Luiz Carvalho e Fábio* pelo total suporte e apoio.

Aos meus companheiros de Laboratório da Genomika, *Rodrigo, Marcel e George*, por não medirem esforços para me ajudar na concretização desse sonho.

Ao Laboratório *Genomika*, pela oportunidade que me foi dada no começo da minha carreira.

Por fim, a todas as pessoas que passaram por mim nessa minha caminhada e que, de alguma forma, contribuíram, direta ou indiretamente, para o sucesso deste projeto.

RESUMO

Realizar uma comparação das características clínicas e laboratoriais em pacientes com suspeita clínica de Criopirinopatia que não apresentam mutação germinativa. Destacar os achados clínicos, laboratoriais e genéticos dos pacientes com a mutação no gene CIAS1, diferenciando as mutações germinativas das somáticas. Estudo tipo coorte transversal feito com 104 pacientes com doenças autoinflamatórias, a fim de identificar os que efetivamente possuíam suspeita clínica de Criopirinopatia, sendo esses acompanhados em diferentes centros de reumatologia do Brasil. Os dados foram obtidos através da metodologia de sequenciamento de segunda geração com tabulação dos resultados, resumindo as características clínicas e laboratoriais encontradas, correlacionando-as com os dados genéticos. Dos 104 pacientes estudados com doenças autoinflamatórias, 37 apresentaram suspeita clínica para Criopirinopatia, mas sem mutação germinativa em CIAS1. Desses 37 pacientes, 06 (17%) apresentaram mutação somática confirmada neste gene. Conclui-se com o trabalho a importância de realizar o sequenciamento genético de segunda geração em pacientes com síndromes auto inflamatórias e sem diagnóstico definido para captação de variantes de nível somático.

Palavras-chave: CIAS1. NLRP3. Criopirinopatias. Mutação Somática. Perfil Clínico e Laboratorial.

ABSTRACT

To perform a comparison of clinical and laboratory characteristics in patients with clinical suspicion of Cryopyrinopathy and without presenting a germ mutation. To highlight the clinical, laboratory and genetic findings of the patients with the mutation in the *CIAS1* gene, differentiating the germinative mutations from the somatic ones. A cross-sectional study was carried out with 104 patients followed at different rheumatology centers in Brazil and with clinical suspicion of cryopyrinopathy. The data were obtained through the second generation sequencing methodology with tabulation of the results, summarizing the clinical and laboratory characteristics found, correlating them with the genetic data. Of the 37 patients with suspected Cryopyrinopathy without germ mutation in *CIAS1*, 06 (17%) presented a confirmed somatic mutation in this gene. It is concluded with the work the importance of performing the second-generation genetic sequencing in patients with auto-inflammatory syndromes and with no definite diagnosis for the uptake of somatic level variants.

Key Words: *CIAS1*. *NLRP3*. Cryopyrinopathies. Somatic Mutation. Clinical and Laboratory Profile.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA GERAL	14
FIGURA 2 – PROTOCOLO NEXTERA XT	17
FIGURA 3 – ETAPA DE AMPLIFICAÇÃO	18
FIGURA 4 – SEQUENCIAMENTO POR SÍNTESE	18
FIGURA 5 – DESCRIÇÃO MUTAÇÃO E567K	20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RELAÇÃO SEXO, IDADE E LOCALIZAÇÃO DA COORTE	15
TABELA 2 – PRIMERS UTILIZADOS PARA O SEQUENCIAMENTO DE <i>CIAS1</i> ..	16
TABELA 3 – RELAÇÃO COMPARATIVA NUMÉRICA ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS ESTABELECIDOS E ESTUDADOS NA ANÁLISE DA PESQUISA	19
TABELA 4 – MUTAÇÕES	20
TABELA 5 – DADOS DE ALTA E BAIXA PREVALÊNCIA DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO EM <i>CIAS1</i> E/OU SUSPEITA DE CRIOPIRINOPATIA E AQUELES SEM MUTAÇÃO	21
TABELA 6 – SINTOMAS DE ALTA PREVALÊNCIA	22
TABELA 7 – SINTOMAS DE BAIXA PREVALÊNCIA	22
TABELA 8 – RELAÇÃO FENÓTIPO, CLÍNICA E LABORATORIAL	23
TABELA 9 – RELAÇÃO FENÓTIPO, IDADE E SEXO	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 JUSTIFICATIVA	13
1.2 OBJETIVOS	13
2 CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
2.1 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DAS CRIOPIRINOPATIAS	15
2.2 AVALIAÇÃO GENÉTICA DAS SÍNDROMES AUTO INFLAMATÓRIAS	16
2.3 PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO	16
2.4 OLIGONUCLEOTÍDEOS E CONDIÇÕES DE PCR	16
2.5 SEQUENCIAMENTO DE SEGUNDA GERAÇÃO	17
3 RESULTADOS	19
4 DISCUSSÃO	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXO A (TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO)	30
ANEXO B (FORMULÁRIO DE PESQUISA)	35

1 INTRODUÇÃO

Síndromes anti-inflamatórias (AI), também conhecidas como síndromes hereditárias de febre periódica, são doenças raras, caracterizadas por episódios de febre associados a sintomas sistêmicos. Além da febre, as principais manifestações clínicas de paciente portadores de AIS são combinações variadas de artrite, serosite, inflamação ocular, inflamação no sistema nervoso central e rash cutâneo. Pacientes não diagnosticados precocemente e, dessa forma, sem o tratamento adequado, podem adquirir algumas complicações graves como amiloidose secundária, bem como lesões permanentes em articulações e sistema nervoso¹⁻⁵.

Em sua grande maioria, essas síndromes afetam moléculas da imunidade inata e são monogênicas, ou seja, são causadas por alterações genéticas em um único gene, sendo essas alterações também conhecidas como distúrbios Mendelianos. Estas se diferenciam das doenças autoimunes clássicas por não causarem distúrbios nos elementos da imunidade adaptativa (linfócitos T ou B), não sendo observados auto-anticorpos circulantes ou linfócitos T auto-reativos. As interleucinas (IL) pró-inflamatórias possuem também um papel central em sua etiopatogenia⁶.

Recentes estudos permitiram avanços no entendimento molecular dos mecanismos de inflamação, bem como na identificação de alterações genéticas implicadas na gênese dessas doenças⁷.

Dentre estes avanços, destaca-se a caracterização do inflamassomo, um complexo de proteínas intracelulares que reconhece patógenos ou dano celular e regula a transformação das formas inativas de IL1 β e IL18 em suas formas ativas, modulando a resposta inflamatória⁷.

Mutações no gene *NLRP3*, que codifica NALP3, também chamada de criopirina, levam à doenças do grupo de criopirinopatias. As criopirinopatias são doenças autossômicas dominantes causadas por mutações no gene *NLRP3* (também chamado de *CIAS1*). O *CIAS1* possui 9 exons e está localizado na região cromossômica 1q44, codificando uma proteína chamada criopirina, responsável pela regulação da inflamação e da apoptose.

Essa proteína se expressa em neutrófilos, monócitos e condrócitos. Alterações na criopirina causam produção persistente de IL1 β e ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear κ B (NF- κ B), provocando uma resposta inflamatória excessiva⁸⁻¹².

Há três criopirinopatias que representam gravidade: a doença inflamatória multissistêmica de início neonatal (NOMID/CINCA), a síndrome de Mucke-Wells (MWS) e a urticária familiar associada ao frio (FCAS)¹³⁻¹⁴.

A FCAS é a criopirinopatia menos grave, seguida pela MWS. No extremo de maior gravidade clínica se encontra NOMID¹³⁻¹⁴.

As três síndromes deste espectro clínico se caracterizam por febre e rash cutâneo urticariforme não pruriginoso e se iniciam na infância (ou após a segunda década de vida na MWS). Podem apresentar também conjuntivite (FCAS, MWS), uveíte (CINCA), surdez neurossensorial (MWS, CINCA), amiloidose sistêmica (FCAS, MWS, CINCA), precipitação do surto pela exposição ao frio (FCAS), envolvimento do sistema nervoso central incluindo neurite óptica, papiledema, meningite crônica asséptica, déficit do desenvolvimento neuropsicomotor (CINCA), dismorfia facial (CINCA), artralgia ou artrite (FCAS, MWS) e aumento do volume ósseo por displasia osteocartilaginosa (CINCA)¹³⁻¹⁴.

O reconhecimento da elevada produção de IL-1 nesses pacientes levou à introdução dos antagonistas de IL-1 (anakinra, canakinumabe e rilonacept), que modificaram, consideravelmente, o prognóstico desses pacientes. Dentre eles, apenas o canakinumabe está disponível no Brasil. Esses agentes suprimem todas as manifestações clínicas e revertem algumas das alterações no sistema nervoso central¹³⁻¹⁴.

Apesar dos avanços no entendimento das causas das síndromes autoinflamatórias, mutações germinativas em *CIAS1* são encontradas em apenas 30 a 60% dos pacientes com achados clínicos compatíveis com criopirinopatia^{9,15}. Uma possível explicação para esse fato seria a existência de outras causas genéticas, ainda não descobertas, que poderiam simular uma criopirinopatia¹⁶⁻¹⁸.

Porém, dois estudos recentes de Saito e Tanaka, utilizados como base para elaboração desse estudo, demonstraram que até 70% dos pacientes com quadro clínico de criopirinopatia, mas sem mutação germinativa em *CIAS1* possuem, na verdade, mutações somáticas nesse mesmo gene, presentes em um percentual de 4 a 35% das células sanguíneas¹⁶⁻¹⁸.

Para uma maior compreensão, por mosaïcismo somático, entende-se a presença de mutações de DNA presentes apenas em determinados tecidos ou células, mas não em todo o organismo, como é visto em mutações germinativas¹⁹⁻²⁰.

Esse achado implica que o método de sequenciamento de primeira geração (Sanger) mais amplamente utilizados para diagnóstico das criopirinopatias, não é adequado, tendo em vista que dependerá da qualidade da sequência, capacidade e tempo disponível do analista. Além disso, é incapaz de detectar variantes de frequência inferior a 20%¹⁹⁻²⁰.

A alternativa para detecção de variantes dessa natureza é o sequenciamento de segunda geração que, dependendo da técnica e plataforma empregada, pode detectar variantes germinativas e somáticas presentes em frequências tão baixas quanto 3 a 5% com alta especificidade¹⁹⁻²⁰.

1.1 JUSTIFICATIVA

Atualmente, mutações em *CIAS1* são identificadas em apenas 55 a 60% dos pacientes com achados clínicos compatíveis com uma criopirinopatia. Artigos recentes indicam que até 70% desses pacientes podem portar mutações somáticas em *CIAS1*, presentes em cerca de 4 a 35% das células sanguíneas. Até o presente momento, não existem dados brasileiros sobre a prevalência de variantes somáticas em *CIAS1*.

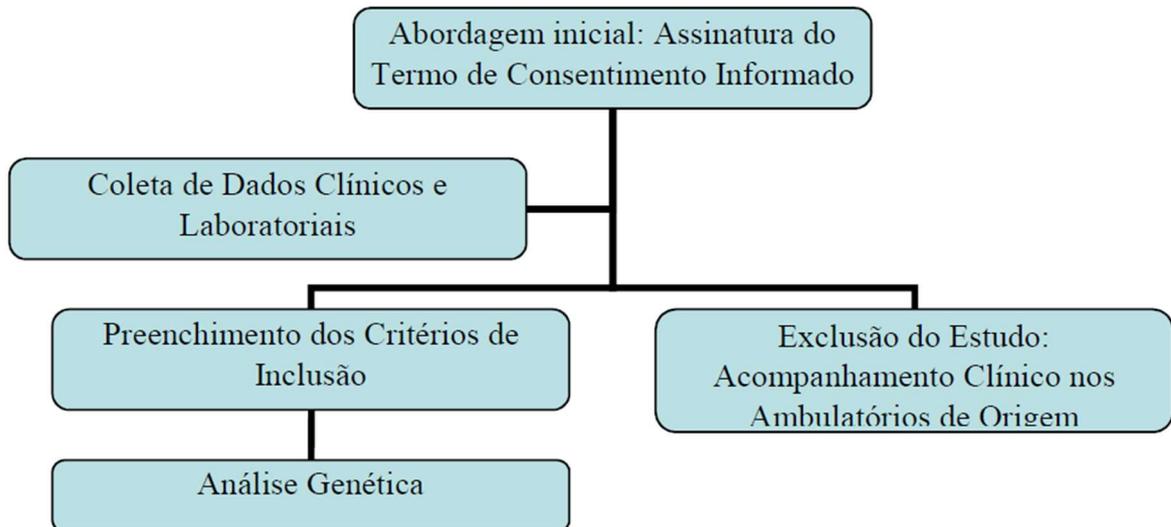
1.2 OBJETIVOS

O presente estudo elencou, como ponto principal, definir a frequência de mutações somáticas em *CIAS1* em pacientes com achados clínicos compatíveis com uma criopirinopatia, mas sem mutações germinativas nesse gene, bem como também compara as características clínicas e laboratoriais entre pacientes com mutações germinativas e somáticas em *CIAS1*.

2 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O estudo seguiu o seguinte fluxograma:

Figura 1 - Fluxograma Geral



Fonte: O Autor (2017)

Foi realizado um estudo do tipo corte transversal com pacientes de diferentes centros de reumatologia no Brasil. A população do estudo baseou-se em pacientes que apresentaram suspeita clínica de apresentaram criopirinopatias, mas sem mutação germinativa, acompanhados nestes centros.

Como critérios de inclusão foram estudadas variáveis biológicas como sexo e idade, além de características clínicas, laboratoriais e genéticas.

Os pacientes selecionados foram identificados e foi solicitada a autorização de utilização de seus prontuários a partir do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) para que fossem utilizados seus dados. Após avaliação de critérios de inclusão, os prontuários dos pacientes foram analisados de acordo com dados clínicos, laboratoriais e genéticos.

Cento e quatro pacientes foram selecionados, dentre eles, 52% eram do sexo masculino e 48% eram do sexo feminino, com média de idade 12,5 anos e em grande maioria localizados na Região Sudeste e Sul (51,92% / 25,92%) e em pequena parte na Região Nordeste e Centro-oeste (17,3% / 2,88%), como demonstra a tabela 1 abaixo. Não houve pacientes avaliados da região norte do país.

Tabela 1 - Relação Sexo, Idade e Localização da Coorte

Relação Sexo, Idade e Localização da Coorte						
			%			
	Masc.	54	52%	Média de Idade		
Sexo				12,5 anos		
	Fem.	50	48%			
			%		%	
	RJ	13	12,50%	GO	2	1,92%
Localização	SP	37	35,58%	BA	3	2,88%
por estado	MG	3	2,88%	PB	2	1,92%
	PR	16	15,38%	DF	1	0,96%
	RS	9	8,65%	ES	1	0,96%
	PE	6	5,77%	SC	2	1,92%
	CE	7	6,73%			

Fonte: O Autor (2017)

Os dados foram coletados no período entre novembro de 2015 a maio de 2016. Os responsáveis pelas crianças que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo e assinara o termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados coletados foram agrupados em planilha Excel e a análise descritiva realizada no EpiInfo 3.5.2, envolvendo a distribuição de frequência para as variáveis categóricas e medidas de tendência central para as variáveis contínuas.

2.1 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DAS CRIOPIRINOPATIAS

O estudo teve como base o preenchimento de um protocolo de coleta de dados clínicos e demográficos (Anexo 2). Sendo analisados dados referentes às características demográficas, manifestações clínicas e laboratoriais, evolução, assim como a terapêutica utilizada.

Os principais exames complementares realizados na rotina do seguimento ambulatorial desses pacientes também foram avaliados.

2.2 AVALIAÇÃO GENÉTICA DAS SÍNDROMES AUTO INFLAMATÓRIAS

Os pacientes que se enquadraram nos critérios estabelecidos no Protocolo de avaliação clínica e laboratorial das criopirinopatias para uma das criopirinopatias, tiveram o gene *CIAS1* sequenciado por técnicas 2^a gerações.

2.3 PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 OLIGONUCLEOTÍDEOS E CONDIÇÕES DE PCR

As regiões exônicas do gene *NLRP3* foram amplificadas por PCR convencional utilizando os primers listados na tabela 2.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 13 µl utilizando-se da GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega), com protocolo adaptado, utilizando os seguintes volumes: 6 µl da GoTaq® Hot Start Polymerase, 4 µl de H₂O Ultrapura, 1 µl do Upstream primer, 1 µl do Downstream primer e por fim 1 µl do DNA Template.

As condições de termociclagem para amplificar o gene *CIAS1* serão: 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 45 seg e uma extensão adicional de 72°C por 5 min.

Tabela 2 - Primers utilizados para o sequenciamento de CIAS1.

EXON	FORWARD	REVERSE
1	5'-GGCTGGTCTTGAATTCCTCA-3'	5'-AGGTTGCAGTGAGCCAAGAT-3'
2	5'-GCTCCCAACCAGACTTTTGA-3'	5'-GACTGCAAGAGCCACACAAA-3'
3 a	5'-GTTACCACTCGCTTCCGATG-3'	5'-CCTCGTTCTCCTGAATCAGAC-3'
3 b	5'-CATGTGGAGATCCTGGGTTT-3'	5'-GCTGTGGCAACAGTATTTGG-3'
4	5'-CGGAAGGCATTTCTCTGAAC-3'	5'-AAGAAACCACACCAGCAACC-3'
5	5'-AGGTGTGTCCTGATGCTTCC-3'	5'-CCTCACTGAAGCCAGAGTGC-3'
6	5'-GAGTAGAGGCAGTGGCAGGT-3'	5'-CCTCCAGTCCTTCAAAGCAT-3'
7+8	5'-TTGGCTCTTTCTGTCGGACT-3'	5'-TCCAGCTTAGCCTTGGTGAT-3'
9	5'-AGTGCAACCCAGGCTTCTA-3'	5'-TCACAGAGCTGTGGTCTTGG-3'

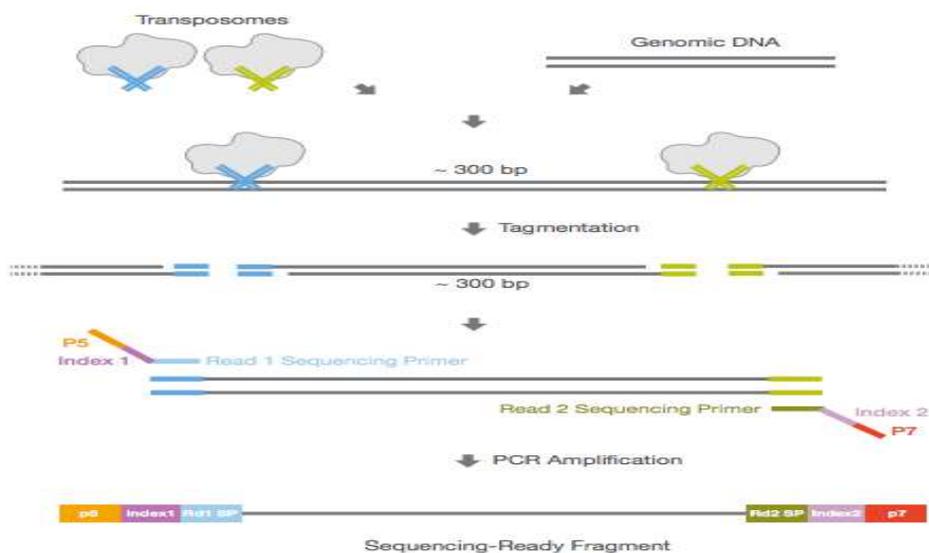
Fonte: O Autor (2017)

2.5 SEQUENCIAMENTO DE SEGUNDA GERAÇÃO

Após a extração do material genético do paciente e amplificação do gene *CIAS1*, os produtos de PCR foram, então, limpos e preparados para reação de sequenciamento usando Nextera XT DNA Library Kit (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante.

Utilizando as condições descritas no protocolo o kit Nextera XT utiliza uma enzima chamada transposomo capaz de tagmentar o DNA genômico em fragmentos de aproximadamente 300 bp, em seguida, marca o DNA com adaptador. A etapa seguinte da PCR adiciona o restante das sequências de adaptador com índices em ambas as extremidades do DNA, as quais servem como código de barra para a identificação de cada amostra, conforme apresenta a Figura 2.

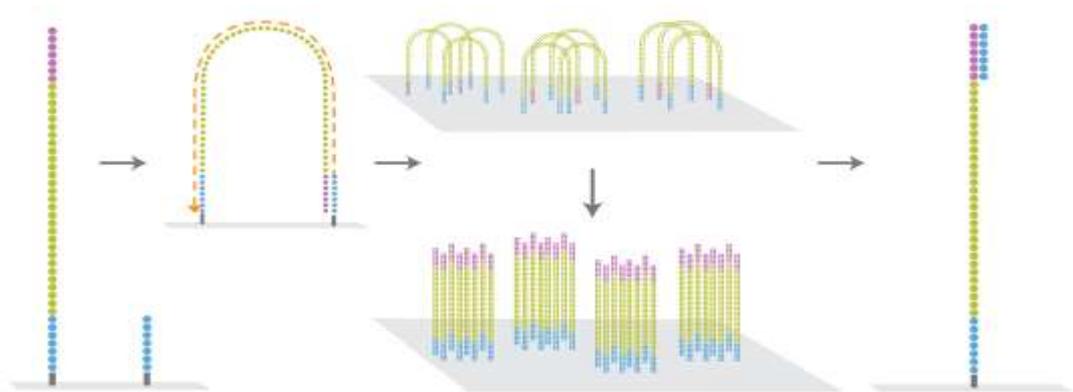
Figura 2 - Protocolo Nextera XT



Fonte: ILLUMINA

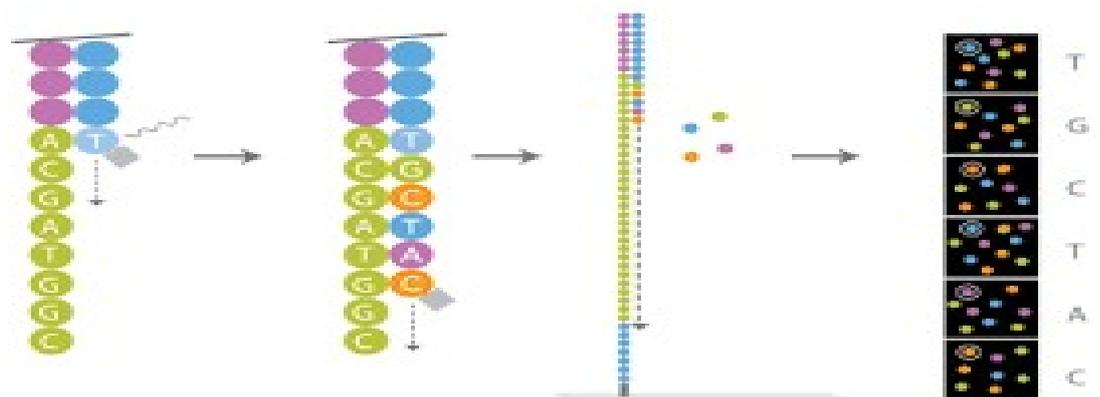
Após esse processo, o fragmento de leitura (Fragmento + Adaptador + Index) irá se fixar ao seu fragmento complementar na *FLOWCELL* onde ocorrerá a sua amplificação, de acordo com a figura 3, e posteriormente, o sequenciamento por síntese, conforme apresenta a Figura 4.

Figura 3 - Etapa de Amplificação



Fonte: ILLUMINA

Figura 4 - Sequenciamento por síntese.



Fonte: ILLUMINA

Os dados foram processados através de scripts desenvolvidos pelo Laboratório GENOMIKA.

Para confirmar o achado, uma segunda amplificação, proveniente da mesma amostra, foi reprocessada em uma outra corrida.

3 RESULTADOS

Cento e quatro pacientes foram selecionados para o estudo, sendo 39 pacientes (correspondente a 37% do total da amostra) os que apresentaram suspeita clínica para criopirinopatia, Do total de pacientes com suspeita de mutação em *CIAS1*, onze (28% do total da amostra) apresentaram mutação confirmada nesse gene. Dos onze, cinco (45% da amostra com suspeita para criopirinopatia) possuíam uma mutação do tipo germinativa e seis (54% do total da amostra com criopirinopatia) do tipo somática, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Relações comparativas numéricas entre os diferentes grupos estabelecidos e estudados na análise da pesquisa

Relação (R) / Amostra (A)	R/A = %
Pacientes com suspeita de mutação em <i>CIAS1</i> / Total de paciente da pesquisa	39 / 104 = 37%
Pacientes com mutação em <i>CIAS1</i> / Total de pacientes da pesquisa	11 / 39 = 28%
Pacientes com mutação germinativa / Total de pacientes com mutação em <i>CIAS1</i>	5 / 11 = 45%
Pacientes com mutação somática / Total de pacientes com mutação em <i>CIAS1</i>	6 / 11 = 54%
Pacientes com mutação somática / Pacientes com suspeita de mutação em <i>CIAS1</i>	6 / 34 = 17%
porém sem mutação germinativa	

Fonte: Autor (2017)

Todos foram incluídos na análise, utilizando o transcrito NLRP3-001 ID: ENST00000336119.7, 4170 bp, 1036aa, NM_001243133.

Do total de pacientes com suspeita de clínica para Criopirinopatia, mas sem mutações germinativas, seis (17%) apresentaram mutação somática.

Destes seis positivos, 3 (50%) apresentaram mutação no éxon 3, 2 no éxon 8 (33%) e 1 (17%) no éxon 1, como descrito na tabela 4 abaixo:

Tabela 4 - Mutações

Mutação Somática	DP	VF
NLRP3:NM_001243133:exon3:c.1699G>A:p.E567K	3589	10,51%
NLRP3:NM_001243133:exon3:c.1905G>C:p.M635I	2091	2,59%
NLRP3:NM_001243133:exon3:c.1305G>T:p.K435N	6265	6,76%
NLRP3:NM_001243133:exon8:c.2843A>G:p.N948S	1857	2,93%
NLRP3:NM_001243133:exon8:c.2843A>G:p.N948S	2164	3,04%
NLRP3:NM_001243133:exon1:c.257A>G:p.K86R	1165	2,23%

Fonte: O Autor (2017)

A média de profundidade das mutações somáticas foi de **2855**.

Apenas a mutação somática, c.1699G>A:p.E567K é descrita no site infervers, como mostra a figura 5 abaixo:

Figura 5 - Descrição – Mutação E567K

E567K	
Location in the gene	exon 3
Usual name <small>Name as first published or submitted to Infervers. May be different from the HGVS edited protein and sequence names.</small>	E567K
HGVS protein name	p.Glu567Lys
HGVS sequence name	c.1699G>A
rs Number	rs104895389
Sequence	cDNA: AACTATGGCAAATTCGAAAAGGGGTATTTGA
Alteration	Substitution
N base(s)	1
Base substituted	G>A
Consequence	No effect
Functional tests	Yes
N Controls	200
Technique(s) used	Sequencing Sanger
Change/define RFLP	Unknown
Disease related symptoms in this patient	Symptomatic
Associated phenotype in this patient <small>a variant observed in symptomatic subjects does not imply its causal role.</small>	Muckle-Wells Syndrome
Country of origin / Ancestry	Japan / Asian
Reference	Saito M, Nishikomori R, Kambe N, Fujisawa A, Tanizaki H, Takeichi K, Imagawa T, Iehara T, Takada H, Matsubayashi T, Tanaka H, Kawashima H, Kawakami K, Kagami S, et al. Disease-associated CIAS1 mutations induce monocyte death, revealing low-level mosaicism in mutation-negative cryopyrin-associated periodic syndrome patients. <i>Blood</i> . 2007
Comment	Associated with mosaicism
Input date	2008-01-25
Contributed by	Ryuta NISHIKOMORI

Fonte: Site Infervers

No grupo de suspeitos como naqueles com a mutação confirmada a grande maioria iniciou os sintomas na faixa etária após a fase adulta (em torno dos 25 anos de idade – 66%) e a minoria na fase infantil (34%).

Em relação ao sexo, 66,66% dos pacientes que apresentaram mutação somática foram do sexo masculino e 33,34% foram do sexo feminino.

Quatro desses pacientes, ou seja, 66% não apresentaram histórico familiar positivo com sintomatologia similar, 17% apresentaram (1 paciente) e 17% (1 paciente) desconhecem tal informação.

Realizando um breve comparativo entre pacientes com mutação em *CIAS1* (e/ou suspeita clínica para criopirinopatia) com pacientes que não apresentaram essa variante, os sintomas de alta prevalência encontrados, em comum, entre os dois grupos foram: febre (66% a 80%), presença de rash (50% a 80%), artralgia (66% a 100%) e dor em membros (66% a 80%).

Avaliamos, ainda, outros sintomas encontrados em menor prevalência em ambos os grupos, dentre eles: associação da piora do rash com o frio (16,6% / 40%), faringite (16,6% / 40%), vômitos (16,6% / 40%), diarreia (33,3% / 40%) e papiledema (16,6%/ 20%). Não houve óbitos no presente estudo, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados Clínicos de alta e baixa prevalência dos pacientes com mutação em *CIAS1* e/ou suspeita de Criopirinopatia e aqueles sem mutação.

Prevalência	Dados Clínicos	Grupo sem mutação %	Grupo com Mutação e/ou Suspeita %
Alta Prevalência	Febre	80%	66%
	Presença de Rash	80%	50%
	Artralgia	100%	66%
	Dor em Membros	80%	66%
Baixa Prevalência	Rash piora com o frio	40%	16,6%
	Faringite	40%	16,6%
	Vômitos	40%	16,6%
	Diarreia	40%	40%
	Papiledema	20%	16,6%

Fonte: O Autor (2017)

Os sintomas de alta prevalência em pacientes com mutação somática foram: febre (66%), presença de rash (50%) - sendo, em sua grande maioria, generalizado - , artralgia (66%) e dor em membros (66%), conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Sintomas com alta prevalência

SINTOMAS ALTA PREVALÊNCIA	
FEBRE	66%
RASH	50%
ARTRALGIA	66%
DOR EM MEMBROS	66%

Fonte: O Autor (2017)

Foram avaliados, ainda, outros sintomas, os quais foram encontrados em menor prevalência em pacientes com mutação somática, dentre eles: associação da piora do rash com o frio (16,6%), faringite (16,6%), vômitos (16,6%), diarreia (33,3%), papiledema (16,6%), conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Sintomas com baixa prevalência

SINTOMAS MENOR PREVALÊNCIA	
RASH ASSOCIADO AO FRIO	16,6%
FARINGITE	16,6%
VÔMITOS	16,6%
DIARREIA	33,3%
PAPILEDEMA	16,6%

Fonte: O Autor (2017)

Nenhum dos pacientes apresentaram abscessos cutâneos, osteomielite, uveíte, atraso no desenvolvimento psicomotor e meningite asséptica.

Apenas 1 paciente, ou seja 16,6%, com mutação somática apresentou melhora clínica da doença com a utilização de um antagonista. Não houve óbitos no presente estudo.

Os dados laboratoriais mais frequentes em pacientes com mutação foram: aumento de PCR (50%), aumento de VHS (66,6%), aumento da ferritina e diminuição da albumina (66%), como demonstra a Tabela 8.

Tabela 8 - Relação fenótipo, clínica e laboratorial X Mutação Somática

Mutação Somática	Fenótipo	Principais Sintomas	Elevação Laboratorial	Diminuição Laboratorial
exon3:c.1699G>A:p.E567K	Muckle-Wells	Rash, Urticária, Lesão Erisipela e Artralgia	VHS, PCR	-
exon3:c.1905G>C:p.M635I	Sem Definição	Febre recorrente, Dor Abdominal e Artralgia	VHS e Ferritina	Albumina
exon3:c.1305G>T:p.K435N	Sem Definição	Febre recorrente, Dor Abdominal e Artralgia	VHS, PCR e Ferritina	Albumina
exon8:c.2843A>G:p.N948S	Sem Definição	Rash, Urticária, Lesão Erisipela e Artralgia	VHS, PCR e Ferritina	Albumina
exon8:c.2843A>G:p.N948S	Sem Definição	Febre recorrente, Dor Abdominal e Artralgia	VHS e Ferritina	Albumina
exon1:c.257A>G:p.K86R	Sem Definição	Febre recorrente, Dor Abdominal e Artralgia	-	-

Fonte: O Autor (2017)

Em relação a identificação do fenótipo da doença verificou-se que um (16,6%) dos pacientes apresentava história compatível com Síndrome de Muckle-Wells e no restante (83,4%) não foi possível estabelecer uma definição clara, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Relação Fenótipo, Idade e Sexo

Mutação Somática	DP	VF	Idade (Início dos Sintomas)	Sexo	Fenótipo
exon3:c.1699G>A:p.E567K	3589	10,51%	8 anos	Masc.	Muckle-Wells
exon3:c.1905G>C:p.M635I	2091	2,59%	21 anos	Masc.	Sem Definição
exon3:c.1305G>T:p.K435N	6265	6,76%	4 meses	Fem.	Sem Definição
exon8:c.2843A>G:p.N948S	1857	2,93%	26 anos	Fem.	Sem Definição
exon8:c.2843A>G:p.N948S	2164	3,04%	25 anos	Masc.	Sem Definição
exon1:c.257A>G:p.K86R	1165	2,23%	19 anos	Masc.	Sem Definição

Fonte: O Autor (2017)

Em um contexto geral, as mutações somáticas aparecem em pacientes do sexo masculino, entre o início da fase adulta, sem um fenótipo definido, como relatado na tabela acima.

4 DISCUSSÃO

Cento e quatro pacientes foram selecionados para o estudo e incluídos na análise genética, sendo 39 (37% da amostra) os que apresentaram suspeita clínica para criopirinopatia.

Onze (28%) apresentaram mutação confirmada nesse gene. Dos onze, cinco (45%) possuíam uma mutação do tipo germinativa e seis (54%) do tipo somática (Tabela 1). Porém, dos pacientes que apresentavam suspeita clínica de Criopirinopatia, mas não apresentavam mutações germinativas, a relação com as mutações somáticas é de 17%.

Tal resultado difere, percentualmente, do estudo de Saito, o qual afirma que até 70% dos pacientes com achados clínicos positivos para criopirinopatias (CAPS), e sem mutação germinativa em *CIAS1*, podem apresentar, na verdade, uma mutação do tipo somática.

Essa menor taxa de positivos se dá, provavelmente, pela dificuldade de reconhecer os pacientes devido à inexistência de triagem por outras metodologias. A incorreta caracterização e definição da doença pelos médicos pode ser outro fator de justificativa da menor taxa.

Tanto no grupo de suspeitos como naqueles com a mutação confirmada a grande maioria dos pacientes tiveram os sintomas iniciados na faixa etária após a fase adulta (em torno dos 25 anos de idade – 66%) e a minoria na fase infantil (34%).

Tal informação encontrada está de acordo com a literatura, em estudo francês de 2010 que mostra a importância do achado, pois limita o aparecimento dos sintomas próximo dos 20 anos, como um critério preditivo positivo quando associado com os sintomas clínicos.

Em sua maioria, os pacientes com mutação somática em *CIAS1*, ou seja, 66% da amostra, não apresentaram histórico familiar positivo com sintomatologia similar, e o restante desconhece ou não apresenta histórico familiar.

Os sintomas com maior ocorrência foram: febre, artralgia, dor em membros e presença de rash sendo, em sua grande maioria, generalizado.

Os sintomas de menor ocorrência foram: associação da piora do rash com o frio, faringite, vômitos, diarreia, papiledema.

Todos os sintomas apresentados são comuns em várias outras doenças autoinflamatórias. Ressaltamos a importância de considerar a possibilidade de criopirinopatia

mesmo quando a febre não for o sintoma predominante, visto que, as Síndromes Muckle-Wells e urticária relacionada ao frio, são doenças que apresentam febre mais baixas, podendo ser despercebidas por familiares.

Apenas 1 paciente com mutação somática, ou seja 16,6%, apresentou melhora clínica da doença. Não houve óbitos no presente estudo. Ressaltamos aqui a difícil condução e rara remissão dos pacientes com CAPS.

O achado do rash urticariforme deve ser destacado, pois, como já sugerem diversos outros estudos, a presença dele é um importante fator diferenciador da CAPS, quando comparado com outras doenças auto inflamatórias. A presença de surdez pode ser outra ferramenta de orientação às CAPS, achado incomum em outras doenças auto inflamatórias e bem descrito, particularmente, em dois espectros da CAPS, na CINCA e na síndrome de Muckle Wells.

Os dados laboratoriais mais frequentes, em ambos os grupos, foram: aumento de PCR, aumento de VHS e aumento da ferritina e albumina. Estes são achados inflamatórios sistêmicos inespecíficos, mas de importância diagnóstica. O estudo francês citado anteriormente determina que um PCR elevado seria outro fator preditivo positivo para CAPS, quando associado aos demais sintomas clínicos.

Em relação à identificação do fenótipo da doença, verificou-se que, um dos pacientes, apresentava história compatível com Síndrome de Muckle-Wells. Para os demais não foi possível estabelecer uma definição clara.

Em diversos estudos, a definição fenotípica é algo difícil de ser concluído, pela similaridade das patologias e pelo quadro clínico em comum entre elas, fato reiterado na nossa pesquisa.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se com o presente estudo a suma importância de realizar um estudo genético nos pacientes com síndromes autoinflamatórias e sem um quadro definido de diagnóstico, focando na importância do sequenciamento de segunda geração (NGS) para que seja possível rastrear pacientes com mutações com baixa frequência alélica.

Importante também salientar quão necessário é traçar um perfil clínico, laboratorial e genético desses pacientes para que algumas manifestações possam servir como ferramenta de auxílio diagnóstico e orientação investigativa.

Frisamos, no fim, a busca de novos estudos para melhor compreensão do tema, e melhor entendimento sobre mutações germinativas e somáticas nas doenças autoinflamatórias.

REFERÊNCIAS

- AKSENTIJEVICH I.; C D.P.; REMMERS E.F.; et al. The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 4, p. 1273-85, 2007.
- CHITKARA P.; STOJANOV S.; KASTNER D. L. The hereditary autoinflammatory syndromes. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 26, n. 4, p. 353-4, 2007.
- FELDMANN J.; PRIEUR A.M.; QUARTIER P.; et al. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 1, p. 198-203, 2002.
- GATTORNO M.; FEDERICI S.; PELAGATTI M.A.; et al. Diagnosis and management of autoinflammatory diseases in childhood. **J Clin Immunol**, v. 28 s. 1, p S73-83, 2008.
- GATTORNO M.; MARTINI A. Inherited autoinflammatory syndromes: an expanding new group of chronic inflammatory diseases. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 23, n. 2, p. 133-6, 2005.
- GOLDBACH-MANSKY R.; DAILEY N.J.; CANNA S.W.; et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. **N Engl J Med**, v. 355, n. 6, p. 581-92, 2006.
- GOLDBACH-MANSKY R.; PUCINO F.; KASTNER D.L. Treatment of patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease/chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: comment on the article by Matsubara et al. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 6, p. 2099-101, author reply 101-2, 2007.
- HOFFMAN H.M.; MUELLER J.L.; BROIDE D.H.; WANDERER A.A.; KOLODNER R.D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nat Genet**, v. 29, n. 3, p. 301-5, 2001.
- IZAWA K.; HIJIKATA A.; TANAKA N; et al. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. **DNA Res**, v. 19, n. 2, p. 143-52, 2012.
- JESUS A.A.; FUJIHIRA E.; WATASE M.; et al. Hereditary Autoinflammatory Syndromes: A Brazilian Multicenter Study. **J Clin Immunol**, 2012.
- JESUS A.A.; SILVA C.A.; SEGUNDO G.R.; et al. Phenotype-genotype analysis of cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS): description of a rare non-exon 3 and a novel CIAS1 missense mutation. **J Clin Immunol**, v. 28, n. 2, p. 134-8, 2008.
- KASTNER D.L. Hereditary periodic Fever syndromes. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology**, p. 74-81, 2005.
- KOHLMANN A.; KLEIN H.U.; WEISSMANN S.; et al. The Interlaboratory RObustness of Next-generation sequencing (IRON) study: a deep sequencing investigation of TET2, CBL and KRAS mutations by an international consortium involving 10 laboratories. **Leukemia**, v. 25, n. 12, p. 1840-8, 2011.

MASTERS S.L.; LOBITO A.A.; CHAE J.; KASTNER D.L. Recent advances in the molecular pathogenesis of hereditary recurrent fevers. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 6, n. 6, p. 428-33, 2006.

NEVEN B.; CALLEBAUT I.; PRIEUR A.M.; et al. Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2809-15, 2004.

SAITO M.; FUJISAWA A.; NISHIKOMORI R.; et al. Somatic mosaicism of CIAS1 in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 11, p. 3579-85, 2005.

SAITO M.; NISHIKOMORI R.; KAMBE N.; et al. Disease-associated CIAS1 mutations induce monocyte death, revealing low-level mosaicism in mutation-negative cryopyrin-associated periodic syndrome patients. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2132-41, 2008.

SIMON A.; VAN DER MEER J.W. Pathogenesis of familial periodic fever syndromes or hereditary autoinflammatory syndromes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 1, p. R86-98, 2007.

STOJANOV S.; KASTNER D.L. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. **Current opinion in rheumatology**, v. 17, n. 5, p. 586-99, 2005.

TANAKA N.; IZAWA K.; SAITO M.K.; et al. High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: results of an International Multicenter Collaborative Study. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 11, p. 3625-32, 2011.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Termo de consentimento livre e esclarecido:**

“AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS EM CIAS1 EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE CRIOPIRINOPATIA SEM MUTAÇÃO GERMINATIVA EM NLRP3 (CIAS1)”.

Pesquisador Responsável: João Bosco de Oliveira Filho

Telefone para contato: (81) 98652-0845

Contato e-mail: jboliveirafilho@gmail.com

Pesquisadores participantes:

1. Rafael Espósito de Lima

Telefone para contato: (87) 99958-7272

Contato e-mail: espositobiomedico@gmail.com

2. Sérgio Crovella

Telefone para contato: (81) 2101-2501

Contato e-mail: crovelser@gmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você ou o menor (criança ou adolescente) sob sua responsabilidade está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa no IMIP.

A participação nesta pesquisa é inteiramente voluntária e não existirá nenhuma taxa, nem recompensa financeira para os participantes e suas famílias.

Você pode se recusar a participar e pode desistir de participar do estudo em qualquer momento. Em qualquer um dos casos, você não perderá nenhum benefício ao qual tenha direito.

Pode ser que você não receba benefícios pela participação. Esta pesquisa pode nos proporcionar conhecimentos que podem vir a ajudar outras pessoas no futuro.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

Objetivo

O objetivo deste protocolo de pesquisa é analisar os aspectos clínicos e genéticos de pacientes portadores de doenças auto-inflamatórias acompanhados no IMIP.

Os testes do laboratório de pesquisa serão realizados com o seu sangue (ou do menor sob sua responsabilidade). Para certos estudos, o DNA, o material genético, será purificado de seu sangue (ou do menor). Então, esse DNA será usado para tentar procurar os genes envolvidos em distúrbios relacionados com a reação inflamatória do seu organismo (ou do menor).

Procedimentos

Para realização dos exames é necessária a coleta de 5ml de sangue dos pacientes menores de 2 anos e 10 ml para os demais grupos etários. O sangue será retirado de seu braço (ou do menor sob sua responsabilidade) de acordo com as precauções universais, com agendamento prévio no Serviço de Imunologia Clínica.

O material retirado (sangue, linhagens celulares, proteínas, plasma, soro, DNA ou RNA) será estocado em bancos de amostras, e utilizados para pesquisas futuras.

A retirada de sangue implica em inserir uma agulha numa veia do braço e isso é levemente incômodo, mas não é perigoso. Pode causar uma mancha roxa, mas ela desaparece. Às vezes, alguns pacientes têm que ser puncionados mais de uma vez em uma única sessão de retirada de sangue. Ocasionalmente, os pacientes podem sentir tonturas ou desmaiar durante ou imediatamente após a retirada de sangue. Isso, normalmente, é causado por ansiedade e desaparecerá após um período curto de tempo. Seus médicos sempre lhe informarão sobre a quantidade de sangue que será retirada de cada vez. Você tem toda liberdade para recusar-se a doar sangue para pesquisa.

É importante informar seu médico (ou do menor sob sua responsabilidade) sobre qualquer quantidade de sangue que foi retirada em outros centros médicos para que o total de sangue retirado em um período de seis semanas possa ser mantido em limites seguros. Em casos raros, gotejamento lento de sangue no local da retirada ou infecção podem ocorrer. Para minimizar esse risco, o local da retirada do sangue será limpo antes com um antisséptico e será aplicada pressão após a retirada do sangue.

Você (ou o menor sob sua responsabilidade) tem liberdade para se recusar a participar deste protocolo sem pôr em risco qualquer outro cuidado que você (ou seu filho) esteja recebendo no IMIP.

Durante o estudo de seu material genético, pode ser que descubramos uma mutação genética que, à primeira vista, não tenha uma relação óbvia com seu distúrbio imunológico. Entretanto, a menos que possamos confirmar com mais estudos que a mutação genética tem alguma relação, nós não lhe informaremos sobre a descoberta. Se acharmos que essa informação é relevante para o cuidado de sua saúde, nós a forneceremos a você ou ao seu médico. Além disso, esses estudos genéticos podem revelar mutações em genes não relacionados com a sua doença atual, mas que podem ter impacto no risco de outras doenças. Se for este o caso, os pesquisadores do IMIP irão lhe informar do achado.

Questões Gerais

Armazenamento de Espécimes e Dados – O acesso a todo seu material (amostras de sangue, prontuários médicos ou dados) será limitado. O material receberá números de identificação para proteger sua identidade.

Futuras Pesquisas – Parte do sangue que retiramos de você será congelado para possíveis estudos futuros. É possível que, futuramente, sua amostra de sangue seja usada para outros propósitos de pesquisa que não estão especificados neste formulário de consentimento, para tanto será utilizado um novo Termo de Consentimento. Também é possível que informações desses estudos sejam publicadas na literatura médica. Nesse caso, sua identidade não será incluída nessas publicações.

Compensação – Não há compensação financeira neste estudo. Portanto, não haverá cobertura de despesas com transporte ou com outro tipo de custo.

Participação em outros estudos de pesquisa – Este formulário de consentimento se refere especificamente à sua participação no protocolo de pesquisa descrito acima. É possível que no

futuro lhe peçamos para participar em outros protocolos de pesquisa. Mesmo que você assine este formulário de consentimento, você não é obrigado a participar em outros protocolos de pesquisa. A escolha de não participar neste protocolo não irá penalizá-lo caso você deseje participar em outros protocolos de pesquisa. Se lhe pedirem para participar em protocolos de pesquisa futuros, lhe darão formulários de consentimento separados.

Confidencialidade - Quando os resultados de uma pesquisa do IMIP são divulgados em publicações médicas ou em congressos científicos os participantes não são identificados. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação ou a do menor (criança ou adolescente).

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o Projeto de Pesquisa, agora ou a qualquer momento.

Nome e Assinatura do pesquisador

João Bosco de Oliveira Filho

Em caso de dúvida em relação a este documento, você poderá entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa – CEP do IMIP, localizado à Diretoria de Pesquisa do IMIP, Rua dos Coelhoos, 300 Recife-PE, Telefone: (81) 2122-4756. Funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30hs (manhã) e 13:30 às 16:00hs (tarde).

COMPLETE O(S) ITEM(NS) APROPRIADO(S) ABAIXO:

A. Consentimento de paciente adulto

Eu, _____ RG _____ li as explicações sobre este estudo e me foi dada a oportunidade de discuti-lo e fazer perguntas. Por meio deste, eu dou meu consentimento para participar deste estudo.

B. Autorização dos pais ou responsáveis para pacientes menores de idade.

Eu, _____ RG _____ li as explicações sobre este estudo e me foi dada a oportunidade de discuti-lo e fazer perguntas. Por meio deste, eu dou meu consentimento para meu/minha filho(a) participar deste estudo.

_____	_____
Assinatura do paciente adulto/representante legal	Data

_____	_____
Assinatura dos pais/Responsáveis	Data

C. Consentimento verbal do menor (Se aplicável)

As informações contidas no consentimento acima foram descritas ao meu/minha filho(a) e meu/minha filho(a) concorda em participar no estudo.

_____	_____
Assinatura dos pais/Responsáveis	Data

_____	_____
Assinatura do investigador	Data

_____	_____
Testemunha	Data

ANEXO B – FORMULÁRIO DE PESQUISA**FORMULÁRIO DE PESQUISA**

“AVALIAÇÃO DA FRENQUÊNCIA DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS EM CIAS1 EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE CRIOPIRINOPATIA SEM MUTAÇÃO GERMINATIVA EM NLRP3 (CIAS1)”.

Pesquisador Responsável: João Bosco de Oliveira Filho

Telefone para contato: (81) 98652-0845

Contato e-mail: jboliveirafilho@gmail.com

Formulário para coleta de dados:

INFORMAÇÕES GERAIS

1. Nome do paciente: (iniciais)
2. Serviço de Reumatologia Pediátrica: Sim Não
3. Número de identificação:
4. Data do levantamento:
5. Raça: Negro Branco Pardo Amarelo
6. Sexo: Masculino Feminino
7. Idade atual: (Em anos)
8. Idade do início dos sintomas:
9. Idade da suspeita diagnóstica:
10. Idade do diagnóstico (se confirmado):
11. Tempo de evolução:
12. História familiar:

INFORMAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

1. Febre

Temperatura: (Em graus)

Duração: _____

Recorrente: Sim Não

Intervalo: _____ (Em dias/semanas/meses)

Frequência: _____

Contínua: Sim Não

Horário: (hh:mm)

2. Rash

Local: _____

Prurido: Sim Não

Urticária: Sim Não

Lesão tipo erisipela: Sim Não

Piora com o frio: Sim Não

3. Outras lesões cutâneas

Acne: Sim Não

Abscessos: Sim Não

4. Biópsia de pele

Alteração da biópsia de pele: Sim Não

5. Perda de peso Sim Não

6. Dismorfia facial Sim Não

7. Estomatite Sim Não

8. Faringite Sim Não

9. Dor torácica Sim Não

10. Pericardite

Número de surtos de pericardite:

Eco alterado: Sim Não

11. Pleurite

Número de surtos de pleurite:

Pleurite bilateral: Sim Não

12. Dor abdominal

Peritonite: Sim Não Duração:

Recorrente: Sim Não Contínua: Sim Não

13. Esplenomegalia Sim Não

14. Hepatomegalia Sim Não

15. Linfonomegalia Sim Não

16. Adenite cervical Sim Não

17. US abdome alterado Sim Não

18. Vômitos Sim Não

19. Diarreia Sim Não

20. Artrite Sim Não Duração:

Quais: _____

21. Artralgia Sim Não

Quais: _____

22. Dor em membros Sim Não

Local: _____

23. Mialgia Sim Não

Local: _____

24. Cistos sinoviais Sim Não

Local: _____

25. Aumento de volume ósseo Sim Não

Local: _____

26. Osteomielite Sim Não

Local: _____

27. Artrite piogênica asséptica Sim Não

Local: _____

28. Abscesso cutâneo Sim Não

Local: _____

29. Alteração radiográfica Sim Não

30. Uveíte anterior aguda Sim Não

31. Uveíte anterior crônica Sim Não

32. Uveíte intermediária Sim Não

33. Uveíte posterior Sim Não

34. Conjuntivite Sim Não

35. Edema periorbitário Sim Não

36. Surdez Sim Não

37. Atraso de DNPM Sim Não

38. Meningite asséptica Sim Não

39. Neurite óptica Sim Não

40. Papiledema Sim Não

41. Anemia (Hb < 10) Sim Não

Menor Hb:

Duração:

42. Leucocitose (> 12.000) Sim Não

Maior leucocitose:

Duração

43. Plaquetose (Plaquetas > 450.000) Sim Não

Maior plaquetose:

Duração:

44. Aumento de VHS (>20) Sim Não Maior VHS:

45. Aumento PCR Sim Não

Maior PCR:

46. Aumento de ferritina Sim Não

Maior valor:

47. Diminuição de albumina Sim Não

Menor valor:

48. Aumento de α_2 Sim Não

Maior valor:

49. Aumento de gamaglobulina Sim Não

Maior valor:

50. SSA alterado Sim Não

51. Estudo genético

Mutação em CIAS1: Somática Germinativa

Outro gene pesquisado: _____

Alteração: _____

52. Corticóide oral Sim Não Duração

53. Corticóide pulso Sim Não Duração

54. Colchicina Sim Não Duração

55. AINH Sim Não Duração

56. MTX Sim Não Duração

57. CSA Sim Não Duração

58. Talidomida Sim Não Duração

59. Imunoglobulina Sim Não Duração

60. Ciclofosfamida Sim Não Duração

61. Infliximabe Sim Não Duração

62. Etanercepte Sim Não Duração

63. Adalimumabe Sim Não Duração

64. Anakinra Sim Não Duração

65. Gotas oftalmológicas Sim Não

66. Outros tratamentos Sim Não

Quais _____

67. Amiloidose Sim Não

68. Síndrome de ativação macrofágica Sim Não

69. Remissão Sim Não

70. Óbito Sim Não